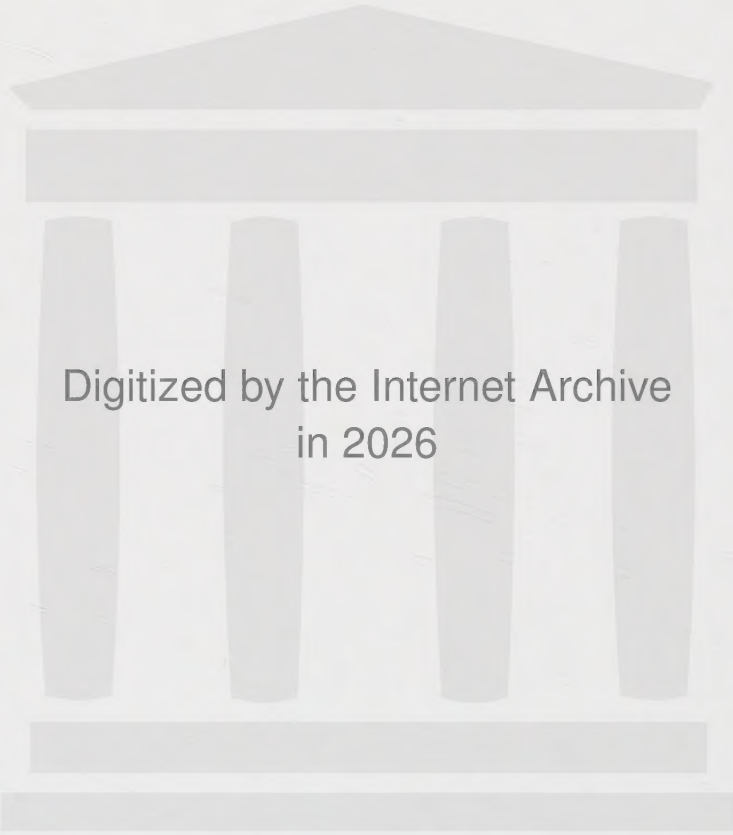


**Untersuchungen zur Beeinflussung der RNA- und
Proteinbiosynthese in
Rattenleber durch Silybin**

Heinrich Rosen

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549007_0036

Untersuchungen zur Beeinflussung der RNA- und Proteinbiosynthese
in Rattenleber durch Silybin

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Heinrich Rosen
aus
Mülheim/Ruhr

Januar 1980



1. Berichterstatter: Priv.Doz.Dr.J. S o n n e n b i c h l e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 1980

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in München-Martinsried in der Abteilung für Organische Chemie und Spektroskopie unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Sonnenbichler in der Zeit vom September 1975 bis September 1979 durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. J. Sonnenbichler für die Betreuung der vorliegenden Arbeit sowie für wertvolle Anregungen und Ratschläge.

Herrn Professor Dr. J. Ruhenstroth danke ich für die wohlwollende Förderung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. H. Wagner danke ich für sein freundliches Entgegenkommen, das mir ermöglichte, meine Arbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie durchzuführen.

Meinen Mitarbeitern Fräulein A. Pohl, Frau I. Zetl, Herrn W. Kittlaus und Herrn G. Pflugfelder danke ich für manche fruchtbare Kommunikation und zahlreiche kritische Diskussionen.

Herzlich danke ich auch meiner Verlobten, Fräulein Dr. R. Klapfenberger für ihren freundlichen Beistand bei der Ausarbeitung des Manuskripts.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. E I N L E I T U N G	1
II. E R G E B N I S S E	4
A. 1. Beeinflussung der rRNA-Synthese durch Silybin in der Rattenleber	4
1.1. Untersuchungen zur Aufnahme von Orotsäure als Vorläufer der Synthese	4
1.2. Untersuchungen zur Beeinflussung der in Ribo- somen eingebauten rRNA	10
2. Studien zum Einfluß von Silybin auf die RNA- Synthese in Hepatocyten	14
2.1. Voraussetzungen	16
2.1.1. Silybinkonzentration in der Zelle	16
2.1.2. Uridinkonzentration in der Zelle	19
2.2. Zeitabhängigkeit der Synthese ohne Silybin	23
2.2.1. Einfluß des pH-Wertes auf die Synthese ohne Silybin	26
2.3. Zeitabhängige RNA-Synthese unter dem Einfluß von Silybin	28
2.3.1. pH-Wert-modifizierter Silybineinfluß	28
2.3.2. Dosisabhängigkeit der RNA-Synthese	30
2.4. Einfluß von Silybinderivaten auf die RNA- Synthese	33
2.4.1. Succinat	33
2.4.2. Glucamat	35
2.4.3. Freies Silybin	37
2.4.3.1. RNA-Synthesestimulierung durch Silybin in Suspension	37
2.4.3.2. Beeinflussung der RNA-Synthese durch Silybin-Na	39
3. Untersuchungen zur Wirksamkeit des Silybins	40
3.1. Stimuliert das Silybin die RNA-Synthese ge- schlechtsspezifisch ?	40
3.2. Einfluß von Silybin auf die RNA-Synthese an- derer eukaryontischer Zellen	43
3.3. Struktur-Wirkungsbeziehung	48
4. Einfluß des Silybins auf die RNA-Synthese in galaktosamingeschädigten Rattenlebern	54

B. 1. Beeinflussung der Proteinbiosynthese bei Hepa-	
tocyten in Kultur	57
1.1. Leucinaufnahme in die Zellen	57
1.2. Abhängigkeit der Proteinbiosynthese von der	
Silybindosis	60
2. Beeinflussung der Proteinbiosynthese bei Ratten-	
lebern	63
2.1. Leucinaufnahme in die Leber	63
2.2. Proteinbiosynthese bei gesunden Ratten . . .	65
2.3. Proteinbiosynthese bei galaktosamingeschädig-	
ten Ratten	67
3. Untersuchungen zur Spezifität der Proteinsyn-	
thesestimulierung	70
III. D I S K U S S I O N	77
IV. E X P E R I M E N T E L L E R T E I L	83
Markierung und Reinigung von ^3H -Silybin	83
Nicht radioaktive Silybinderivate	83
a) Silybin-Na	83
b) Silybin-Glucamat	84
c) Silybin-hemisuccinat	84
d) Silybin	84
Verwendete Tiere	84
Erzeugung einer künstlichen Hepatitis mit D-Galakto-	
samin	85
Auflösung von Blut- und Lebergewebsproben	85
Messungen zur Orotsäure-Silybin-Präzipitation	85
Bestimmung der Silybinkonzentration in der Zelle . .	86
Präparation der Leberzellkerne	86
Ribosomengewinnung und -reinigung	86
Markierung der RNA	87
Reinigung der DNase	87
RNA-Synthese in isolierten Kernen	88
Silikonisierung von Glasgefäßen	88
Kultur- und Waschflüssigkeiten	89
Isolierung und Inkubation der Hepatocyten	89
Gewinnung und Inkubation von Raji-Zellen	91

Bestimmung der TCA-unlöslichen Radioaktivität in Leberorgan, Hepatocyten und Raji-Zellen	92
Bestimmung der TCA-löslichen Radioaktivität in Hepa- tocyten	92
Elektrophoretische Analyse der Leberproteine	92
Analysenmethoden	93
Radioaktivitätsmessungen	93
Bestimmung der RNA-Konzentration	94
Bestimmung der DNA-Konzentration	94
Bestimmung der Proteinkonzentration	94
V. Z U S A M M E N F A S S U N G	95
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	97

I. E I N L E I T U N G

Eine schon seit über zweitausend Jahren im volkstümlichen Arzneischatz verwendete Heilpflanze ist die Mariendistel (*Silybum marianum* Gaertn., *Carduus marianus* L.). Dioskurides (50 nChr.) erwähnt sie in seiner "Materia medica". In den Kräuterbüchern von Hieronymus Bock (1595) und Jakobus Theodorus (1664) ist sie ebenfalls beschrieben. Adam Lonicer (1679) gibt als Indikationsgebiet die Leber an: "Ein Wasser von Blättern gebrannt, davon getruncken, legt das Seitenstechen allermeist wann man ein halb Quintlein deß gestossenen Saamens mit eintrinckt. Und überhaupt ist es gut zu der entzündeten Leber für Ohnmacht und Schwachheit". Im 17. Jhdt. war die Droge in Vergessenheit geraten, wurde aber von dem Arzt Gottfried Rademacher (1772 - 1850) als volksmedizinisches Leber- und Gallemitte! wieder eingeführt. Die neueren Deutschen Arzneibücher beschreiben die Herstellung von Extrakten aus dem Samen. Das wirksame Prinzip befindet sich unter der Samenschale. Es wurde in Reinsubstanz isoliert (1) und die Struktur als die eines Flavonolignans aufgeklärt (2), (Abb. 1). Schließlich wurde die Struktur des Silybins durch Synthese bestätigt (3).

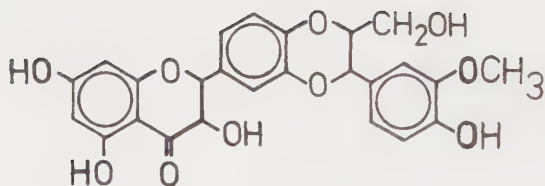


Abb. 1

Strukturformel von Silybin

Im Zusammenhang mit pharmakokinetischen Untersuchungen wurde die Frage interessant, ob und wie Silybin in die biochemischen Prozesse der Zelle eingreift. In tierexperimentellen Untersuchungen war eine antihepatotoxische Wirkung des Silybins festgestellt worden, die jedoch nicht durch eine Aktivierung des fremdstoffabbauenden Enzymsystems erklärt werden konnte (4, 5,6). Die Schutzwirkung des Silybins gegen Schadstoffe wurde vielmehr in antioxidativen und Radikalfängereigenschaften des Moleküls gesehen (7,8), oder auf einen "membranstabilisierenden" Einfluß zurückgeführt (9,10,11,12). MATTERSBERGER (13) stellte eine hohe Anreicherung von radioaktiv markiertem Silybin in der Leber fest. Es bindet intrazellulär unter anderem an Proteine des Zellkerns. Unter dem Einfluß von Silybin

zeigte sich bei Ratten in vivo ein Anstieg des Einbaus von radioaktiv markierter Orotsäure in neusynthetisierte RNA der Leber (14). Weitere Untersuchungen von MACHICAO und SONNEN-BICHLER (15) beschäftigten sich mit der Frage, wie dieser Effekt zustande kommt. An in-vitro-Systemen mit isolierten Zellkernen und Nucleolen konnte gezeigt werden, daß speziell die ribosomale RNA-Synthese durch Silybin stimuliert wird. Dies ist auf eine Aktivierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase-A durch Silybin zurückzuführen. Auch bei enzymkinetischen Untersuchungen erhöhte Silybin kooperativ die Reaktionsgeschwindigkeit der Polymerase-A. Somit war eine zufriedenstellende Erklärung für die in-vivo beobachtete Steigerung der ribosomalen RNA-Synthese gefunden. Obwohl diese Vorarbeiten die Wirkung des Silybins schon sehr detailliert erfassen, blieb noch eine Reihe von Fragen zu klären:

- 1) Bei Ratten in vivo und bei Hepatocyten war der zeitliche Verlauf und die Dosisabhängigkeit der Stimulierung zu untersuchen. Besonders Hepatocyten als "vereinfachtes System" schienen geeignet, diese Parameter zu studieren.
- 2) Wichtig erschien auch die Untersuchung, ob Silybin die Permeabilität der Zellmembran verändert und damit die Aufnahme der RNA-Bausteine (Uridin) beeinflusst.
- 3) Es war von Interesse, ob der Effekt des Silybins spezifisch auf Lebergewebe gerichtet ist, oder ob auch andere Zelltypen beeinflusst werden. Zum Vergleich wurden in der vorliegenden Arbeit Raji-Zellen eingesetzt, Lymphocyten, die durch Infektion mit Epstein-Barr-Virus transformiert wurden.
- 4) An einer Reihe ähnlicher Flavonoide sollte getestet werden, welche Strukturmerkmale des Silybinmoleküls für die Wirkung verantwortlich sind.
- 5) Von besonderer Bedeutung war die Frage, ob die beobachtete Stimulierung der RNA-Synthese eine Steigerung der Proteinbiosynthese zur Folge hat.

II. E R G E B N I S S E

A. 1. Beeinflussung der rRNA-Synthese durch Silybin in der Rattenleber

Frühere Versuche an Ratten haben zwar grundsätzlich den Stimulierungseffekt von Silybin auf die RNA-Synthese gezeigt (13), es war jedoch wegen der Komplexität des Tierstoffwechsels nicht möglich gewesen, exakte Zeit- und Dosisabhängigkeiten zu erstellen. Bei den genannten Untersuchungen war aus silybinbehandelten Tieren die RNA in toto isoliert und analysiert worden. Da aus den Experimenten klar geworden war, daß hauptsächlich die ribosomale RNA betroffen ist, war es naheliegend, aus unbehandelten und behandelten Ratten auch die Ribosomen zu isolieren, um anhand des eingebauten radioaktiv markierten Uridins die Syntheserate der rRNA zu analysieren und die Zeitabhängigkeit des Silybineffekts zu untersuchen.

1.1. Untersuchungen zur Aufnahme von Orotsäure als Vorläufer der Synthese

Als Maß für die Zu- oder Abnahme der in vivo gebildeten rRNA diente der Einbau von radioaktivem Uridin, das in Form von markierter Orotsäure appliziert wurde (16,17,18,19). Selbstverständlich hängt die Einbaurate vom Angebot an Vorstufe ab. Von besonderer Bedeutung war, auszuschließen, daß unter den in vivo Versuchsbedingungen, unter dem Einfluß des Pharmakons Silybin die Orotsäure in unterschiedlichen Konzentrationen in die Leberzellen gelangt. Daher wurde nach i.p. Applikation die Verteilung von ^{14}C -Orotsäure und niedermolekularen Folgeprodukten in Blut und Leber ohne und bei gleichzeitiger Gabe von Silybin gemessen.

Einmal wurden Orotsäure und die wasserlösliche Form des Silybins, das Hemisuccinat (7,9), (Abb. 2), gemeinsam, Tab. 1, (Abb. 3), zum anderen jede Lösung für sich an getrennten Stellen des Bauchraumes, Tab. 1, (Abb. 4) injiziert. Nach 15, 45 und 100 min wurden die Ratten getötet, die Leber- und Blutproben entnommen, mit $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HClO}_4$ aufgelöst und die spezifische Radioaktivität bestimmt.

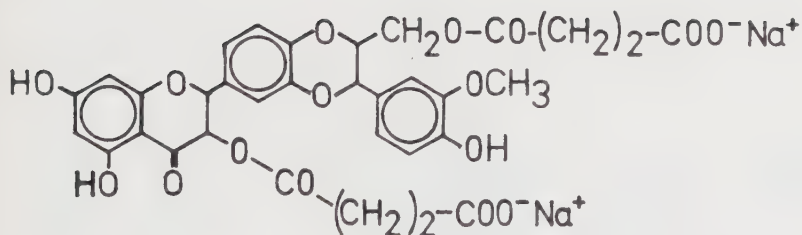


Abb. 2

Strukturformel von Silybinhemisuccinat-Na

T a b e l l e 1

Orotsäureaufnahme in die Rattenleber bei gemeinsamer Injektion
von 10 μ Ci Orotsäure und 20 mg Silybinhemisuccinat in
200 μ l 0.9% NaCl pro Ratte (180 g):

cpm/10 mg Blut			cpm/10 mg Leber	
ohne Silhs	mit Silhs	Zeit (min)	ohne Silhs	mit Silhs
276	17	15'	4986	48
337	320	45'	9986	7606
170	171	100'	12070	9010

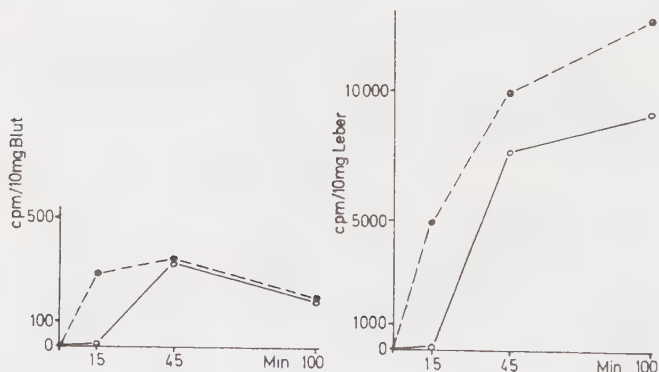


Abb. 3

Zeitabhängigkeit der Orotsäureaufnahme in Blut und in die Ratten-
leber nach gemeinsamer Injektion von 14 C-Orotsäure und Silybinhe-
misuccinat. (Daten in Tab. 1)

- — — — ohne Silybinhemisuccinat
○ — — — mit Silybinhemisuccinat

T a b e l l e 2

Orotsäureaufnahme in Blut und Leber der Ratte bei i.p. Injektion von 10 μCi ^{14}C -Orotsäure und 20 mg Silybinhemisuccinat pro Ratte (180 g), (Lösungsmittel: je 200 μl 0.9% NaCl), an getrennten Stellen des Peritoneums:

cpm/10 mg Blut			cpm/10 mg Leber	
ohne Silhs	mit Silhs	Zeit (min)	ohne Silhs	mit Silhs
37	68	15'	1897	3210
35	30	45'	2148	2893
35	33	100'	2753	3775

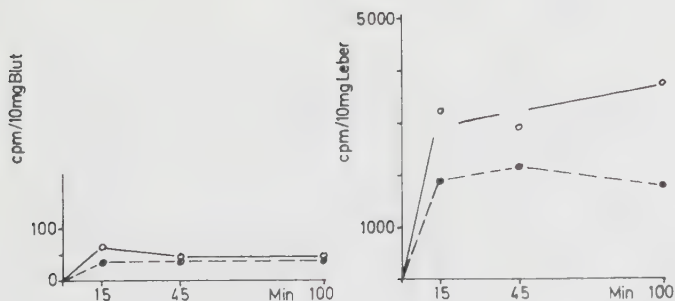


Abb. 4

Zeitabhängigkeit der Orotsäureaufnahme in Blut und Leber der Ratte bei getrennter Injektion von ^{14}C -Orotsäure und Silybinhemisuccinat. (Daten in Tab.2)

- — — — ohne Silybinhemisuccinat
 ● — — — mit Silybinhemisuccinat

Wenn ^{14}C -Orotsäure in gemeinsamer Lösung mit Silybinhemisuccinat injiziert wird, enthält die Leber der silybinbehandelten Ratte nach den in Tab. 1 angeführten Zeitabständen weniger Radioaktivität als die der unbehandelten Ratte (Abb. 3). Außerdem verzögert sich die Radioaktivitätsaufnahme mit Silybin in Blut und Leber um ca. 15 min. Nach 45 min ist in Blut und Leber von behandelten und unbehandelten Tieren Orotsäure bereits stark angereichert.

Wird ^{14}C -Orotsäure getrennt von der Silybinhemisuccinatlösung injiziert, dann wird die Radioaktivität ohne Verzögerung in Blut und Leber von silybinbehandelten und unbehandelten Ratten aufgenommen. Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist, sind hohe Konzentrationen an Radioaktivität jetzt bereits schon nach 15 min erreicht (Abb. 4). Zudem enthalten die Lebern aus silybinbehandelten Ratten mehr Radioaktivität als die aus unbehandelten Ratten. Aus den Daten beider Tabellen wird damit eine unterschiedliche Orotsäureaufnahme in Blut und Leber von silybinbehandelten Ratten ersichtlich, je nachdem ob ^{14}C -Orotsäure in gemeinsamer Lösung mit Silybinhemisuccinat oder jeder Stoff in einer eigenen Lösung injiziert wurde.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine unter den genannten Versuchsbedingungen unterschiedlich erfolgende Resorption der Orotsäure, die darauf beruht, daß sich beide Verbindungen in ihrer Löslichkeit beeinflussen. Es wurde deshalb untersucht, ob Silybin die Löslichkeit von Orotsäure verändert. Silybinhemisuccinat, unmarkierte und ^{14}C -Orotsäure wurden gemeinsam gelöst, 10 min geschüttelt und zentrifugiert. Anschließend wurde die Radioaktivität des Überstandes, die den noch gelösten Orotsäureanteil darstellt, gemessen (Tab. 3).

T a b e l l e 3

Radioaktivität in jeweils 1 ml Überstand der Präzipitate aus den Lösungen von unmarkierter Orotsäure und Silybinhemisuccinat in 2.0 ml 0.9% NaCl unter Zusatz von jeweils 10 μ Ci 14 C-Orotsäure:

mg/ml Lösung			cpm/ml Überstand	
Orots.	Silhs.	Äquiv.	ohne Silhs	mit Silhs
5	5	1/2	202 000	115 000
1	2.5	1	205 000	137 000
1	5	2	198 000	140 000
1	10	4	200 000	182 000
1	20	8	208 000	201 000

In der gemeinsamen Lösung von Orotsäure und Silybinhemisuccinat sind Fällungen zu beobachten. Aus den Mengen der bei verschiedenen Ansätzen im Überstand verbleibenden Radioaktivität kann geschlossen werden, daß die Menge des Orotsäure-Silybinhemisuccinatpräzipitats vom Verhältnis der Äquivalente sowie von den Konzentrationen beider Stoffe abhängt. Silybinhemisuccinatmengen größer als 4 Orotsäure-Äquivalente führen nicht mehr zur Präzipitation. Starke Fällungen treten jedoch bei Orotsäure-Silybinhemisuccinatverhältnissen unter 1:4 auf. In diesem Bereich der Konzentrationsverhältnisse liegt auch die in die Ratte injizierte Menge an Orotsäure und Silybinhemisuccinat. Beide bilden bei gemeinsamer Injektion damit im Bauchraum vermutlich ein Depot. Durch die Bildung dieser schwerlöslichen Addukte wird die geringe Orotsäureaufnahme in die Rattenleber verständlich (Tab. 1, Abb. 3). Es ist daher die Konsequenz zu ziehen, daß Orotsäure und Silybinhemisuccinat nicht an derselben Stelle des Peritoneums injiziert werden dürfen, wenn vermieden werden soll, daß durch unterschiedliche Resorption unterschiedliche Vorläuferkonzentrationen in der Leber entstehen.

1.2. Untersuchungen zur Beeinflussung der in Ribosomen eingebauten rRNA

Wie eingangs skizziert wurde, soll im Folgenden versucht werden, die ribosomale RNA-Synthese in der Weise zu messen, daß zu verschiedenen Zeiten nach Silybinhemisuccinat- und Orotsäureapplikation aus der Rattenleber die Ribosomen isoliert werden und die spezifische Radioaktivität der rRNA bestimmt wird.

Zur Isolierung der Ribosomen wurden die Zellbestandteile aus dem Leberhomogenat fraktioniert zentrifugiert (20). Der rRNA-Anteil der Ribosomen wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die in der Ribosomenfraktion gemessene Radioaktivität wurde auf den rRNA-Anteil bezogen.

Aus Rattenleberhomogenat wird durch fraktioniertes Zentrifugieren eine Mikrosomenfraktion hergestellt. Die Ribosomen werden aus der Mikrosomenfraktion des Zellhomogenats mit Triton X 100 herausgelöst. Das Arbeiten bei 0 - 4°C minimiert den enzymatischen Abbau von Protein und RNA (21). Die im Puffer vorhandenen bivalenten Kationen schützen die Sekundärstruktur des Proteins. Mg^{2+} verhindert die Dissoziation der Ribosomenuntereinheiten in Protein und RNA. Im Isolierungspuffer befindet sich noch Dithiothreitol, ein Reduktionsmittel, das die Biomoleküle vor oxidativen Veränderungen schützt. Die Methode gewährleistet den Erhalt von nativen Ribosomen, bzw. deren rRNA.

In Versuchsserie a) wurde Silybinhemisuccinat und Orotsäure an verschiedenen Stellen des Bauchraums der Ratte zu gleichen Zeiten injiziert. In Serie b) wurden die Ratten verschieden lange mit Silybinhemisuccinat behandelt und die ^{14}C -Orotsäure jeweils 3 Stunden vor dem Töten der Tiere injiziert.

Die aus Serie a) anfallenden Daten sind in Tab. 4 angeführt.

T a b e l l e 4

Zeitabhängigkeit des Uridin- (^{14}C -Orotsäure-)einbaus in rRNA von Ribosomen aus den Lebern silybinbehandelter und unbehandelter Ratten. 10 μCi ^{14}C -Orotsäure und 20 mg Silybinhemisuccinat pro Ratte (180 g)

Zeit nach Silybingabe (Std.n.)	cpm/mg rRNA	
	ohne Silhs.	mit Silhs.
1	5130	7920
2	21480	33700
5	42400	58000
12	92000	30000
14	180000	150000

Die spezifische Radioaktivität der Ribosomen aus Rattenlebern stieg zeitabhängig mit und ohne Silybineinfluß infolge zunehmenden Einbaus von ^{14}C -Orotsäure an. Dabei wurde die ribosomale RNA aus silybinbehandelten Ratten zu Beginn höher markiert als die der unbehandelten Kontrolltiere. Nach 10 Stunden war die Einbaurate von ^{14}C -Orotsäure mit Silybin jedoch niedriger als in den unbehandelten Ratten. Die Resultate späterer Versuche (vergl. Abb. 15) mit Hepatocyten zeigten eine Hemmung der RNA-Synthese unter dem Einfluß einer zu hohen Dosis ($> 10 \mu\text{g/ml}$) Silybinhemisuccinat. Ähnlich wie bei der von der Silybindosis abhängigen Hemmung oder Stimulierung der RNA-Synthese in den Hepatocyten (Abschn. 2.3.2.) könnte das Abklingen der zunächst stimulierten rRNA-Synthese bei Ratten ebenfalls dosisbedingt sein: Durch die Anreicherung von Silybin in der Leber könnte nach einiger Zeit die für eine Stimulierung der rRNA-Synthese geeignete Konzentration überschritten werden, so daß die rRNA-Synthese durch zu hohe Silybinhemisuccinatdosen gehemmt würde. Diese These wird durch folgende Feststellung bekräftigt: Nach einer raschen Resorption des Silybins (1), ist das Pharmakon in der Rattenleber nach 5 Stunden maximal angereichert (13). In den oben beschriebenen Versuchen

fielen die unter Silybineinfluß bis dahin stimulierten rRNA-Syntheseraten später als 5 Stdn. unter die Werte der Syntheseraten in den Lebern von unbehandelten Tieren.

Diese Hypothese konnte durch Versuche mit zeitlich konstanter Orotsäuregabe bestätigt werden. Dabei wurde (in Serie b) am Ende verschiedener Einwirkungszeiten von Silybin eine zeitlich konstante ^{14}C -Orotsäureapplikation durchgeführt. Die experimentellen Daten sind in Tab. 5 und Abb. 5 gezeigt.

T a b e l l e 5

Spezifische Radioaktivität der innerhalb von 3 Stunden am Ende verschiedener Silybineinwirkungszeiten synthetisierten rRNA. 20 mg Silybinhemisuccinat pro Ratte (180 g), 10 μCi ^{14}C -Orotsäure pro Ratte (180 g) drei Stunden vor der Ribosomengewinnung

Zeit nach Silybingabe (Stdn.)	cpm/mg rRNA	
	ohne Silhs.	mit Silhs.
4	32600	40200
11	32500	32800
18	29000	31300
22	30800	38000
27	29600	44000
39	27100	27500

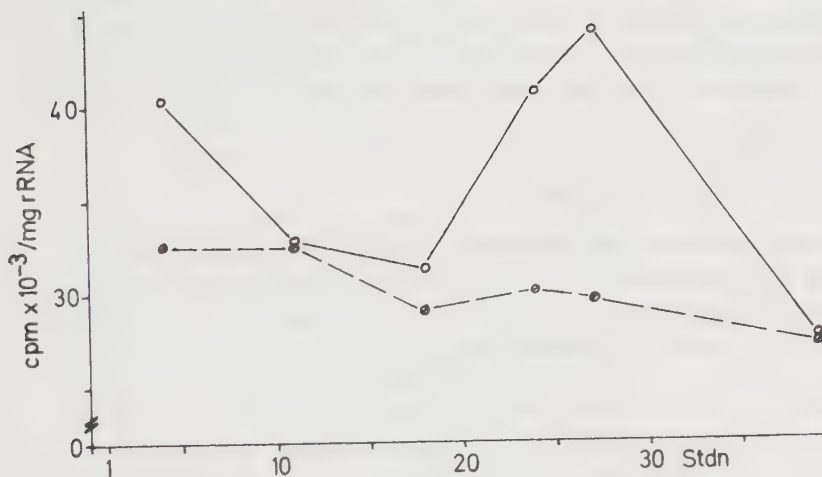


Abb. 5

Spezifische Radioaktivität der rRNA aus isolierten Ribosomen von silybinbehandelten (○ —) und unbehandelten (● — —) Ratten bei konstanter Orotsäuregabe. (Daten siehe Tab. 5).

Wie aus Tab. 5 hervorgeht, blieb die Einbaurrate an Orotsäure durch die zeitlich konstante Orotsäureapplikation bei den unbehandelten Tieren ähnlich. Die rRNA-Synthese war bei silybinbehandelten Ratten nach 4 Stunden stimuliert, fiel nach 10 Stunden auf das Niveau der Kontrolle ab und stieg nach 18 Stunden wieder auf höhere Meßwerte, die erst nach 39 Stunden endgültig absanken. Dieser reproduzierbare wellenförmige rRNA-Syntheseverlauf unter Silybinhemisuccinateinfluß zeigte, daß ein in Serie a) vermutetes Abklingen der Silybinwirkung nach 5 Stunden nicht stattfand, sondern die Silybinwirkung über 30 Stunden anhält. Im Zeitraum von 10 bis 18 Stunden war die rRNA-Synthese offenbar durch Einwirkung zu

hoher Konzentrationen an Silybin, das sich in der Leber angereichert hatte, gehemmt. Wie WAGNER (1), HALBACH (22) und MENNICKE (23) fanden, wird Silybin in Form von Sulfat- und Glucuronidkonjugaten zu 80% mit der Gallenflüssigkeit in den Darm abgegeben. Hier wird es durch die Hydrolysetätigkeit der Darmbakterien wahrscheinlich aus seinen metabolischen Verbindungen freigesetzt und teilweise in den enterohepatischen Kreislauf aufgenommen.

Die hohe, hemmende Silybinkonzentration in der Leber nimmt durch Ausscheidung von Silybin ab und erreicht nach 18 Stdn. wieder die niedrigen, stimulierenden Werte, die sich in dem zweiten Anstieg der rRNA-Synthese bemerkbar machen. Diese zum zweiten Mal gesteigerte rRNA-Synthese hält relativ lange an, vielleicht weil der durch die Galle abgeschiedene Anteil des Silybins in stimulierenden Konzentrationen durch den enterohepatischen Kreislauf immer wieder in die Leber zurückgeführt wird, bevor er endgültig durch den Harn ausgeschieden wird (24,25), so daß die rRNA-Synthese in silybinbehandelten Ratten infolge Verarmung an Silybin schließlich auf die Werte der unbeeinflussten rRNA-Synthese absinkt.

2. Studien zum Einfluß von Silybin auf die RNA-Synthese in Hepatocyten

Die RNA-Synthese wird in vivo durch Silybin zeitabhängig stimuliert. Die Dosisabhängigkeit der Silybinwirkung konnte jedoch nicht untersucht werden, da das in-vivo-System infolge der schwer überschaubaren Resorptionsvorgänge, Tagesrythmen des Gesamtorganismus (26) etc. kaum kontrollierbaren Einflüssen ausgesetzt ist.

Das System wird wesentlich vereinfacht und leichter analysierbar, wenn man die RNA-Synthese an isolierten Hepatocyten beobachtet.

In den folgenden Versuchen wurde die RNA-Synthese zeitabhängig und abhängig von der Silybindosis mit isolierten Hepatocyten untersucht. Auch die zeitabhängige Aufnahme von Silybin und Uridin in die Zelle sowie der Einfluß des pH-Wertes und der Lösungsvermittler für Silybin auf die RNA-Synthese wurden studiert.

Die Vorzüge der Hepatocytensuspension sind, daß viele homogene Proben entnommen werden können und die synthetisierte RNA mit weniger Isolierungsschritten und vollständiger als in vivo erhalten wird. Obwohl die Relevanz in vivo zu in vitro Versuchen eingeschränkt ist, bleiben die organspezifischen Eigenschaften und Funktionen der Leberzelle auch außerhalb des Gewebeverbandes bis zu 10 Stunden erhalten (27,28,29,30,31).

Zur Gewinnung der Hepatocyten wurde die Leber durch eine Collagenase-Perfusion in Einzelzellen dispergiert (32,33,34). Die Vitalität der gereinigten Zellen kann durch Trypanblaufärbung und Zellauszählung bestimmt werden (35). Zur Inkubation wurden je 5×10^5 Zellen/ml in Vollsynthese-Medium (36,37,38,39,40) eingesetzt. Ein Zusatz von Penicillin und Streptomycin verhinderte die Verfälschung der RNA-Syntheserate durch Bakterienwachstum (41). Um mit Sicherheit den Einfluß von Alterungsprozessen der Hepatocyten auszuschließen, wurde im Folgenden die RNA-Synthese nur bis zu höchstens 6 Stunden untersucht (27,28).

Die Syntheserate wurde durch Einbau von radioaktivmarkiertem Uridin,^{*} einem spezifischen Vorläufer der RNA (16,17,18) und anschließender Fällung mit Trichloressigsäure (TCA), (um alle hochmolekularen Bestandteile auszufällen) (42,43), bestimmt.

TCA ist ihres großen Anions und ihrer hohen Acidität wegen ein guter Präzipitator für RNA, DNA und Protein. Das Anion dringt auch bei niedriger Temperatur innerhalb einer Sekunde in die Zelle ein. Es inaktiviert sämtliche Enzyme. TCA löst niedermolekulare Komponenten von der Fällung ab, so daß Reste des UTP-Pools die Messung nicht stören.

*) (spez. Radioaktivität 26.3 Ci/mM)

2.1. Voraussetzungen

Neben der Vitalität der Zellen, die durch die oben beschriebene Präparation gewährleistet war, interessierten zunächst zwei, für die Beobachtung der RNA-Synthese in Hepatocyten unter Silybineinfluß erforderliche Vorbedingungen: die zeitliche Aufnahme von Silybin und die Aufnahme von Uridin in die Zellen.

2.1.1. Silybinkonzentration in der Zelle

Es war interessant, die Permeation des Silybins aus den Zellen zu untersuchen. Der nachfolgende Versuch sollte klären, ob Silybin in der Zelle gebunden oder in einem freien Diffusionsgleichgewicht vorliegt.

Die Hepatocyten wurden mit Silybin inkubiert, das nach der Wilzbachmethode (44) radioaktiv markiert war und als Silybinglucamat in wasserlöslicher Form vorlag (Abb. 6).

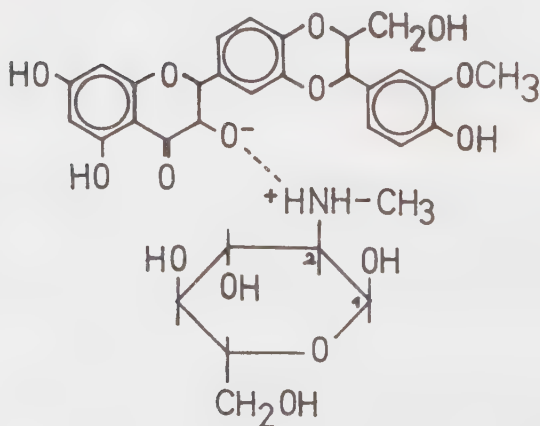


Abb. 6

Silybinglucamat, im Silybinteil unspezifisch nach der Wilzbachmethode ³H-markiert

Nach 30 min wurden die Zellen gewaschen und in radioaktivitätsfreiem Medium resuspendiert. Es wurde die Radioaktivität des in der Zelle verbliebenen Silybins nach verschiedenen Zeiten gemessen (Abb. 7).

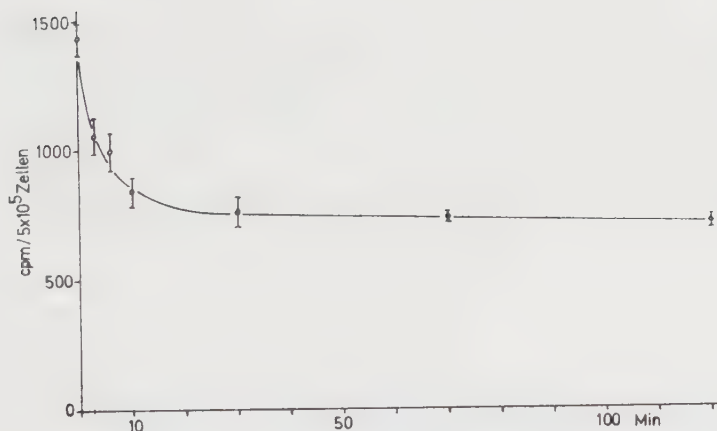


Abb. 7

Zeitabhängiger Restgehalt an ^3H -Silybinglucamat in jeweils 10^6 Zellen/ml nach Gabe von $1.5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Silybinglucamat (spez.Rad. $300 \mu\text{Ci}/\text{mM}$)/ml

Die Silybinkonzentration in den Zellen fiel in den ersten 10 min sehr rasch ab. Da der aktive Transport von Substanzen durch eine Membran eine Kinetik höherer Ordnung darstellt, während für eine freie Diffusion nur eine Kinetik 1. Ordnung zutrifft, müßte im letzteren Fall die exponentielle Gleichung für eine Kinetik 1. Ordnung durch Logarithmieren in eine Geradengleichung übergehen. Nach Auftragung der Werte in halblogarithmisches Papier ("grafisches Kriterium") ergab sich Abb. 8.

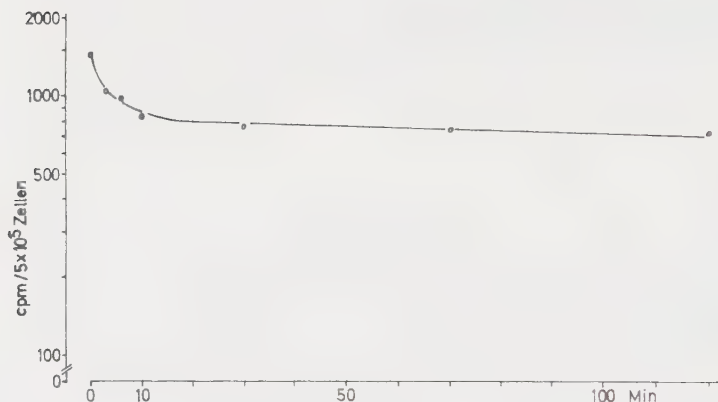


Abb. 8

Halblogarithmische Auftragung der Werte aus Abb. 7

Abb. 8 deutet darauf hin, daß es sich beim Silybinaustritt um eine Kinetik höherer Ordnung handelt. Eine freie Beweglichkeit des Silybins war somit unwahrscheinlich. Obwohl damit auch ein aktiver Transport nicht ausgeschlossen ist, darf man jedoch annehmen, daß neben Diffusion eine Überlagerung von Bindungsprozessen des Silybins in der Zelle und an der Membran eine wesentliche Rolle spielt (11). Zusätzlich zeigte sich in Abb. 7, daß nach dem schnellen Austritt eines Anteils Silybin aus der Zelle in den ersten 10 min ein zweiter Anteil (spezifisch oder unspezifisch gebunden) in der Zelle blieb. Die Voraussetzungen für eine Silybinwirkung sind durch diese längere Verweildauer des Silybins in der Zelle gegeben.

2.1.2. Uridinkonzentration in der Zelle

Die zweite Voraussetzung zum Studium der silybinbeeinflussten RNA-Synthese war die Kenntnis über die Aufnahme des Uridins als RNA-Vorläufer in die silybinbehandelten und -unbehandelten Zellen. Grundsätzlich bestand ja die Möglichkeit, daß Silybin an der Membran bindet und damit deren Permeabilität beeinflusst (11).

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob die Membranpermeabilität für Uridin durch Silybinhemisuccinat beeinflusst wird. Die Hepatocyten wurden gleichzeitig mit Silybinhemisuccinat und Uridin inkubiert und die aufgenommene Uridinmenge nach verschiedenen Zeiten als TCA-lösliche Radioaktivität bestimmt (Abb. 9).

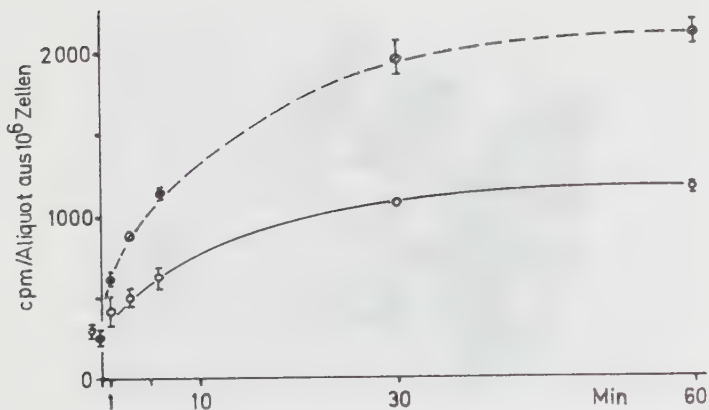


Abb. 9

Zeitabhängigkeit der Uridinaufnahme ($0.5 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Uridin/ml}$) ohne Einfluß (○ ---) und mit Einfluß (○ —) von 1 mg Silybinhemisuccinat/ml

Der Gehalt der Zellen an radioaktivem Uridin stieg an und erreichte nach 30 min nahezu ein Plateau. Die unbehandelten Zellen nahmen mehr Uridin auf, als die mit 1 mg Silybinhemisuccinat/ml inkubierten Zellen. Die verminderte Uridinaufnahme unter Einfluß der verwendeten Silybinhemisuccinatdosis könnte verschiedene Ursachen haben:

- a) Für alle Nucleoside besteht vermutlich nur ein einziges Transportsystem, das durch nucleosidähnliche Stoffe spezifisch gehemmt werden kann (45). Für die Spezifität der Hemmung wäre eine weitgehende sterische Ähnlichkeit des Hemmstoffs mit dem normalen Substrat Voraussetzung. Ein Vergleich der Kalottenmodelle von Silybin und Uridin zeigt tatsächlich, daß die Abstände von charakteristischen funktionellen Gruppen einerseits und die flache sterische Anordnung der Systeme andererseits recht ähnlich sind (Abb. 10):



Abb. 10

Kalottenmodelle (nach Steward-Brigleb) von Silybin (I) und Nucleotid (Guanosin) (II)

b) Neben einer spezifischen Hemmung des Transportsystems für Nucleoside könnte auch eine unspezifische Wechselwirkung von Silybin mit der Membran vorliegen mit der Folge einer Permeationseinschränkung durch die hohe Dosis (300 µg/ml) Silybinhemisuccinat. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Autoren, die eine Beeinflussung einer Reihe von Zellwandeigenschaften durch Silybin fanden (46,47,48,49,50), wobei das Silybin vor allem durch Bindung an die Membran die Permeabilität für verschiedene Stoffe in unterschiedlicher Weise hemmt oder erhöht (51,11,52), ist auch die Hinderung der Uridinpermeation durch eine direkte, aber unspezifische Wechselwirkung des Silybins mit Membranproteinen denkbar (6).

Um zu klären, ob eine verminderte Dosis Silybinhemisuccinat zu einer Verbesserung der Aufnahme von Uridin führt, wurden die Hepatocyten mit 2 µg Silybinhemisuccinat/ml inkubiert, eine Dosis, die, wie später gezeigt wurde, die RNA-Synthese deutlich stimuliert (Abschn. 2.3.2.). Die Daten aus dem Versuch zur Uridinaufnahme unter Einfluß von kleinen Dosen Silybinhemisuccinat (2 µg/ml) sind in Abb. 11 aufgetragen.

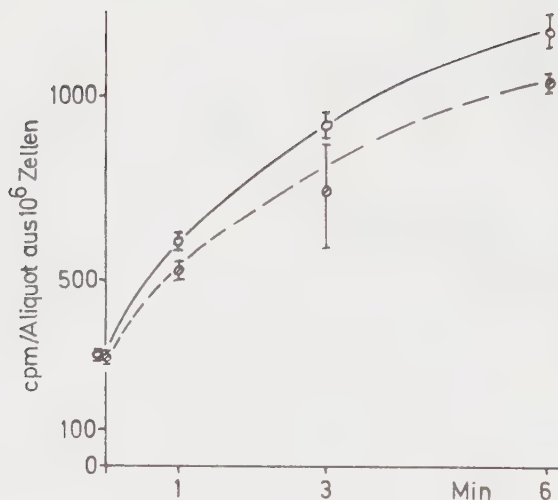


Abb. 11

Uridinaufnahme ($0.5 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Uridin/ml}$) in Hepatocyten ohne Einfluß (○---) und mit Einfluß (○—) von $2 \mu\text{g Silybinhemisuccinat/ml}$

Wie aus Abb. 11 ersichtlich wird, zeigen die mit $2 \mu\text{g Silybinhemisuccinat/ml}$ inkubierten Zellen eine schwach erhöhte Uridinaufnahme im Vergleich zu den unbehandelten. Daß Silybin die Uridinaufnahme durch direkte Beeinflussung des membranären Transportsystems erhöhte, ist unwahrscheinlich. Vielmehr ist anzunehmen, daß der unspezifische, die Uridinaufnahme hemmende Einfluß hoher Dosen Silybinhemisuccinats ($300 \mu\text{g/ml}$) auf die Membran mit Verringerung der Dosis verschwindet. Wahrscheinlich erhöht sich die Membranpermeabilität für Uridin in Anwesenheit kleiner Silybinhemisuccinatdosen durch einen Rückkopplungseffekt infolge der, - wie später gezeigt wurde (Abschnitt 2.3.2.) -, stimulierten RNA-Synthese.

2.2. Zeitabhängigkeit der Synthese ohne Silybin

Zum Studium der RNA-Synthese in Abhängigkeit von der Zeit wurden die Hepatocyten im Medium mit und ohne Silybin und in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Uridin inkubiert. Die Syntheserate wurde durch TCA-Fällung der hochmolekularen Zellbestandteile und Messen der eingebauten Radioaktivität bestimmt.

Zur Messung von Biosyntheseraten ist die Detektion kleinster Mengen markierter Verbindungen Voraussetzung. Dies erreicht man durch radioaktive Markierung mit ^3H oder ^{14}C . Der markierte Vorläufer wird in das Syntheseprodukt eingebaut. Die unmittelbaren Vorläufer der neugebildeten RNA sind Uridinphosphate. Da Nucleosidphosphate die Zellmembran nicht passieren (16), verwendet man einfache Nukleoside oder Vorstufen davon, wie z.B. Orotsäure oder Uridin (18).

Die Spezifität von Uridin zur RNA-Kennzeichnung ist zweifach gesichert. Es wird nicht in DNA eingebaut. Auch wenn es zu Thymidin, einem DNA-Baustein, methyliert würde, schließt die radioaktive Markierung mit ^3H in 5-Stellung einen Fehler aus, da bei Methylierung an dieser Stelle die Radioaktivität verlorengehen würde. Versuche an Leukocytenkulturen beweisen dies (17).

Mehrere Autoren (33,27,38) fällen RNA und Proteine direkt aus der Zellsuspension, um die RNA mit möglichst wenig Manipulationen zu isolieren. In unseren Versuchen zeigte die präzipitierbare Radioaktivität in Anwesenheit von Silybin-hemisuccinat eine bis zu 40-fache "Stimulierung" (Abb. 13). Die Kurve verlief nicht wie bei der silybinfreien Kontrolle sigmoid mit einem Nachlassen der Synthese nach 4 - 5 Stunden (27), sondern schnell ansteigend und auf einem Plateau verharrend. Da diese Steigerung weit über die physiologisch sinnvollen Werte anstieg, wurde zur Kontrolle geprüft, ob sich allein durch Anwesenheit des Silybins und radioaktiver Vorstufe im Medium ohne Zellen radioaktive Präzipitate ergeben würden (Abb. 12).

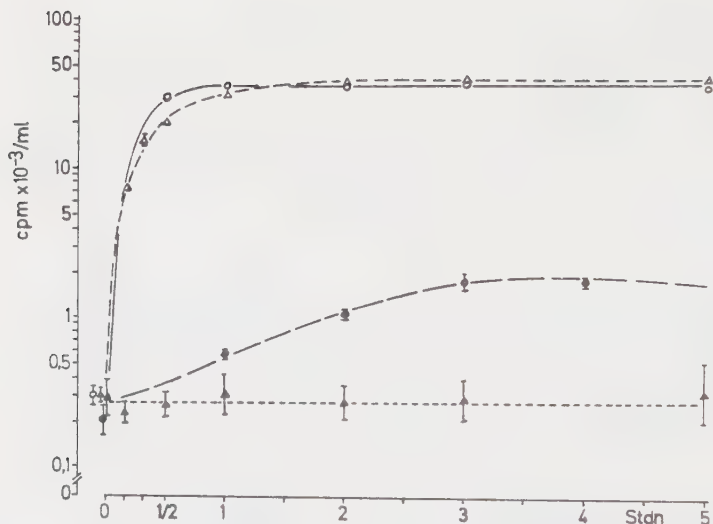


Abb. 12

Logar. Darstellung der zeitabhängigen Bildung radioaktiver Fällungen von Uridin ($1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Uridin/ml}$) und $1 \text{ mg Silybinhemisuccinat/ml}$ (Präzipitatarfakte)

- ▲ Medium mit Uridin ohne Zellen und ohne Silybinhemisuccinat
- △ Medium mit Uridin ohne Zellen und mit Silybinhemisuccinat
- Medium mit Uridin mit Zellen und ohne Silybinhemisuccinat
- Medium mit Uridin mit Zellen und mit Silybinhemisuccinat

Die präzipitierbare Aktivität im zellfreien Medium blieb ohne Silybin auf einem durch den Background bedingten Niveau. Befand sich Silybinhemisuccinat in der Lösung, ergab sich ein zeitabhängiger Anstieg von Radioaktivität in den Fällungen. Es mußte sich also, da keine Zellen im Medium vorhanden waren, um ein artifizielles Produkt handeln (Abb. 12). Bei den Versuchen in vivo hatte sich eine Beeinflussung der Orotsäurelöslichkeit durch Silybinhemisuccinat gezeigt (Abschn. 1.1.). Im vorliegenden Versuch beruhte die "Einbaukinetik" vermutlich auf einer zeitabhängigen Komplexbildung zwischen Silybin

und Uridin während der Inkubation. Bei der Ähnlichkeit des Silybinmoleküls mit Nucleosiden (Abb. 11) sind sandwichförmige π -Komplexe zwischen den aromatischen Molekülteilen von Silybin und Uridin denkbar, die offensichtlich mit TCA zur Kopräzipitation gebracht werden können. Der Niederschlag der TCA-Fällung war im Gegensatz zu Silybinhemisuccinat in Aceton löslich.

Um die RNA-Syntheseraten unter Einfluß von Silybinhemisuccinat unverfälscht messen zu können, mußte somit vor der TCA-Fällung das Silybinhemisuccinat-haltige Medium abzentrifugiert werden. Nach der Fällung wurde zusätzlich der Niederschlag mit Aceton gewaschen, da er noch Anteile von Silybin-Uridin-Komplex enthielt. Durch das Waschen der Zellen und des Niederschlags wurde die Artefaktbildung im hochmolekularen präzipitierbaren Material vermieden (Abb. 13).

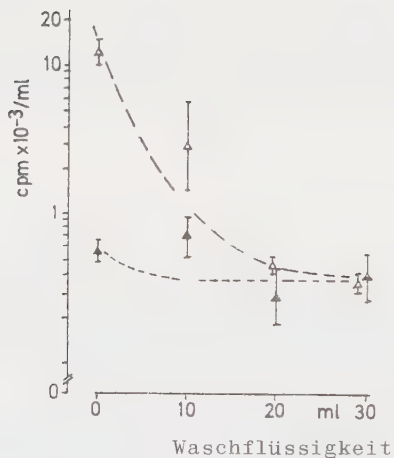


Abb. 13

Eliminierung der artifiziellen Fällung aus 1 μCi ^3H -Uridin/ml und 1 mg Silybinhemisuccinat/ml nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten ohne Zellen durch Waschen mit Aceton auf Whatman-Glasfaserfilter. ▲ Adsorption von Radioaktivität am Filter ohne Silybin

△ Kopräzipitate mit Silybin

2.2.1. Einfluß des pH-Wertes auf die Synthese ohne Silybin

Obwohl nach Verhinderung der Artefaktbildung durch das Waschen der Zellen und des Niederschlags die RNA-Syntheserate nunmehr bestimmt werden konnte, wurden zunächst stark streuende Werte gemessen.

Im Vergleich zu den pH-konstanten Kontrollen ohne Silybin war beim Auflösen des Silybinhemisuccinats im Medium an dem Phenolrotindikator der Kultur eine pH-Wertverschiebung von pH 8 nach pH 7 zu sehen. Es lag daher nahe zu untersuchen, ob die Syntheseschwankungen schon allein durch

die Änderung der pH-Werte zustande kämen und wie der Silybin-
einfluß durch den pH-Wert modifiziert würde. Außerdem war für
die unbeeinflusste RNA-Synthese ein optimaler pH-Wert des Kul-
turmediums zu finden, der für die folgenden Versuche beibehal-
ten werden sollte.

Daher wurde die RNA-Synthese in Hepatocyten im Medium ohne
Silybin, aber bei verschiedenen pH-Werten gemessen (Abb. 14).

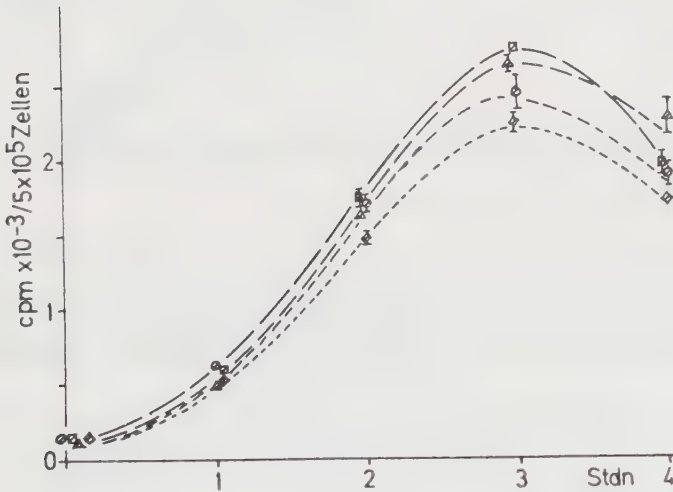


Abb. 14

Abhängigkeit des Einbaus von ^3H -Uridin ($1 \mu\text{Ci/ml}$) in neu-
synthetisierte RNA vom pH-Wert des Mediums ohne Einfluß
von Silybin

○ pH 7.4

◻ pH 7.8

▲ pH 8.2

◈ pH 8.5

Wie man aus Abb. 14 sehen kann, zeigt die RNA-Synthese einen zeitabhängig zunehmenden Einbau von radioaktiv markiertem Uridin mit einem sigmoiden Verlauf der Kurven. Zwischen 2 und 4 Stunden sind die Markierungsraten am höchsten, nach 4 Stunden sind abnehmende Syntheseraten zu beobachten (letzteres wurde auch von BAUR (27) beschrieben). In ihrer Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums zeigte die RNA-Synthese bei pH 7.8 und bei pH 8.2 die höchsten Einbauraten.

Daher wurde als pH-Optimum für die weiteren Untersuchungen ein durchschnittlicher pH-Wert der Zellsuspension von pH 8 angesehen.

2.3. Zeitabhängige RNA-Synthese unter dem Einfluß von Silybin

2.3.1. pH-Wert-modifizierter Silybineinfluß

Um herauszufinden, wie Silybin bei verschiedenen pH-Werten des Mediums die RNA-Syntheseraten beeinflusst, wurde die RNA-Synthese unter konstantem Silybineinfluß bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen beobachtet.

Für diese Versuche wurde wasserlösliches Silybin in Form von Silybinhemisuccinat verwendet und in einer von MATTERSBERGER (13) übernommenen Dosierung von 400 µg/ml gearbeitet.

Nach dem Lösen des Silybinhemisuccinats wurden die pH-Werte der Medien auf pH 7.4, 7.8, 8.2 und 8.5 eingestellt und die Hepatocyten sowie das radioaktiv markierte Uridin hinzugefügt (Abb. 16). Das Medium der Kontrolle wurde auf dem im Abschnitt 2.2.1. festgestellten optimalen pH-Wert (pH 8) gehalten.

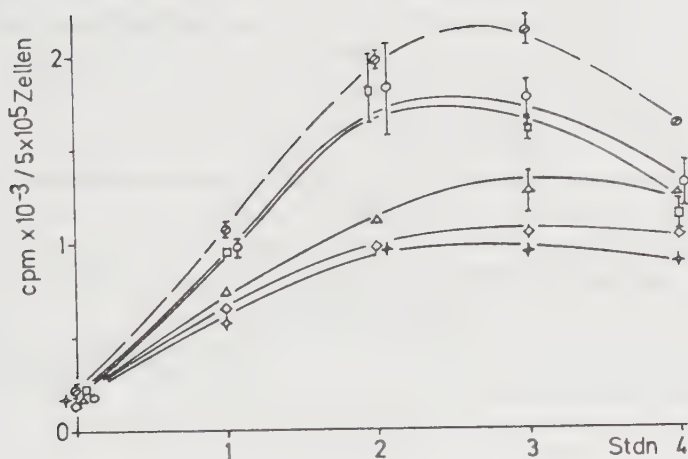


Abb. 15

Zeitabhängiger Einbau von ^3H -Uridin ($1 \mu\text{Ci/ml}$) in neusynthetisierte RNA unter Einfluß von $400 \mu\text{g}$ Silybinhemisuccinat/ml, bei verschiedenen pH-Werten:

○ Kontrolle ohne Silybinhemisuccinat (pH 8.0)

Tests mit Silybinhemisuccinat bei:

○ pH 8.0

◇ pH 8.2

□ pH 7.8

◆ pH 8.5

△ pH 7.4

Die RNA-Syntheseraten unter Einfluß von Silybinhemisuccinat erschienen bei jedem der pH-Werte niedriger als bei den Ansätzen ohne Silybinhemisuccinat. Da die Depression der RNA-Syntheseraten so stark ausgeprägt war, daß dafür der Einfluß des pH-Wertes allein nicht verantwortlich gemacht werden konnte (siehe vorhergehenden Abschnitt), mußte angenommen werden, daß das

Silybin bei den entsprechenden pH-Werten eine unterschiedliche Hemmwirkung entfalten würde. Bei pH 7.8, bei dem die RNA-Synthese unter Verwendung von 400 μg Silybinhemisuccinat/ml am wenigsten gehemmt wurde, lag das Medium nahe dem optimalen pH-Wert der unbeeinflussten RNA-Synthese, bei pH 8.

2.3.2. Dosisabhängigkeit der RNA-Synthese

Da frühere Untersuchungen (15) ohne Zweifel eine stimulierende Wirkung von Silybin auf die RNA-Synthese gezeigt hatten, andererseits aber die hohe Dosis von 400 μg Silybinhemisuccinat/ml auch bei Anwendung des pH-Optimums (pH 8) nicht geeignet war, die RNA-Synthese zu stimulieren, mußte untersucht werden, ob kleinere Dosen Silybinhemisuccinat die RNA-Synthese bei pH 8 positiv beeinflussen (Abb. 16).

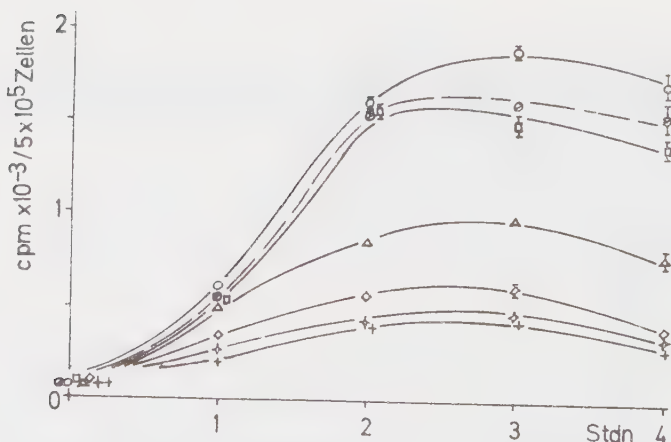


Abb. 16

Abhängigkeit des Einbaus von ^3H -Uridin (1 $\mu\text{Ci/ml}$) in neusynthetisierte RNA von der Silybinhemisuccinatdosis bei pH 8

○ Kontrolle ohne Silybinhemisuccinat

Silybinhemisuccinat	○ 2 $\mu\text{g/ml}$	◇ 400 $\mu\text{g/ml}$
	◻ 10 $\mu\text{g/ml}$	✦ 700 $\mu\text{g/ml}$
	◄ 100 $\mu\text{g/ml}$	+ 1000 $\mu\text{g/ml}$

Der Einbau von Uridin war bei pH 8 unter Verwendung von 100 μg und von 10 μg Silybinhemisuccinat/ml geringer als die der Kontrolle. Die Dosis von 2 μg Silybinhemisuccinat/ml stimulierte jedoch die RNA-Synthese im Vergleich zur Kontrolle um ca. 10% stets signifikant reproduzierbar.

Entnimmt man den gemessenen Kurven die Werte für 2 Stunden, so ergibt sich die Tab. 6 und die Abb. 17, die die RNA-Syntheseraten in Abhängigkeit von der Silybindosis zeigen.

T a b e l l e 6

Abhängigkeit der RNA-Syntheserate von der Silybinhemisuccinatdosis nach 2 Stunden

Silybinhemisuccinatdosis $\mu\text{g/ml}$	RNA-Syntheserate in % der Kontrolle
0	100
2	116
3	119
10	94
15	72
100	70
150	64

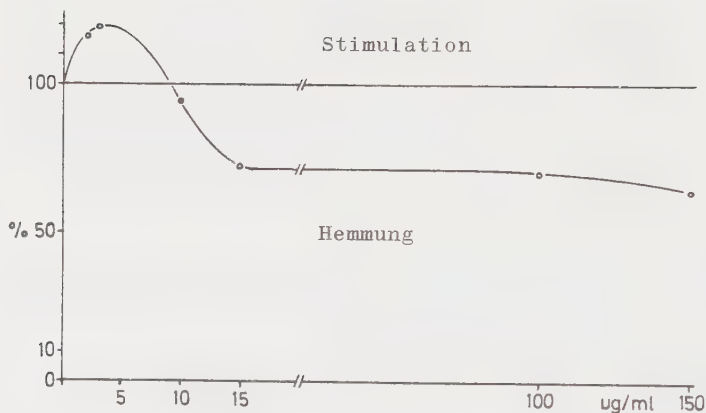


Abb. 17

Dosisabhängigkeit der silybinbeeinflussten RNA-Syntheserate
Aus den Meßwerten bei 2 Stunden der Abb. 16, 22, 23.

Wie man aus Tab. 6 und Abb. 17 sieht, wird bei pH 8 die RNA-Synthese in Hepatocyten durch kleine Dosen Silybin (in Form des Phenolats oder Hemisuccinats) unter 10 µg/ml stimuliert und durch große Dosen über 10 µg/ml gehemmt.

Wegen der, von der Silybindosis abhängigen Membranpermeabilitätseinschränkung für Uridin (Abschnitt 2.1.2.) ist die durch hohe Silybindosen gehemmte RNA-Synthese als Folge einer gehinderten Uridinaufnahme zu erklären, da ja ein direkter Zusammenhang zwischen Uridinaufnahme und RNA-Synthese besteht (53,42).

MACHICAO und SONNENBICHLER (15) haben die RNA-Synthesestimulierung durch kleine Silybindosen bereits eindeutig auf eine Aktivierung der Polymerase A zurückgeführt, die auch von höheren

Silybindosen nicht rückgängig gemacht wird. Daher kann die dosisabhängige Beeinflussung der RNA-Synthese durch Silybin im Bereich kleiner Dosen (unter 10 µg/ml), wo eine Stimulierung auftritt, als Enzymaktivierung erklärt werden, die bei Verwendung höherer Dosen von einem Membraneffekt überlagert wird, der zu einer RNA-Synthesehemmung führt infolge mangelnder Versorgung mit Vorläufermolekülen (vergl. Abb. 11 und 9).

4. Einfluß von Silybinderivaten auf die RNA-Synthese

Um Silybin im wässrigen Medium genügend löslich zu machen, wird es mit hydrophilen Resten kombiniert. Auf die Verwendung des Lösungsvermittlers Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde verzichtet, da dieser selbst die RNA-Synthese und einige Enzyme in Hepatocyten beeinflusst (54,55,56). Zur Herstellung von wasserlöslichen Silybinderivaten eigneten sich der Succinat- und der Glucamatrest (7)(Abb.2 u.19). Das freie Silybin wird dann entweder in der Zelle enzymatisch abgespalten werden oder im Medium durch Dissoziation freigesetzt werden. Es war zur Kontrolle notwendig, zu klären, ob die mit Silybin konjugierten Reste nicht etwa selbst die RNA-Synthese beeinflussen.

4.1. Succinat

Als wichtigstes wasserlösliches Silybinderivat ist das Silybinhemisuccinat anzusprechen (Abb. 2). Da der Succinatrest in der Zelle enzymatisch abgespalten wird, war festzustellen, ob Bernsteinsäure die RNA-Synthese beeinflusst.



Die Hepatocyten wurden daher mit 80 µg/ml Bernsteinsäure, äquivalent 400 µg Silybinhemisuccinat/ml, 20 µg ($\cong$ 100 µg Shs) und 0.4 µg ($\cong$ 2 µg Shs) inkubiert (Abb. 18).

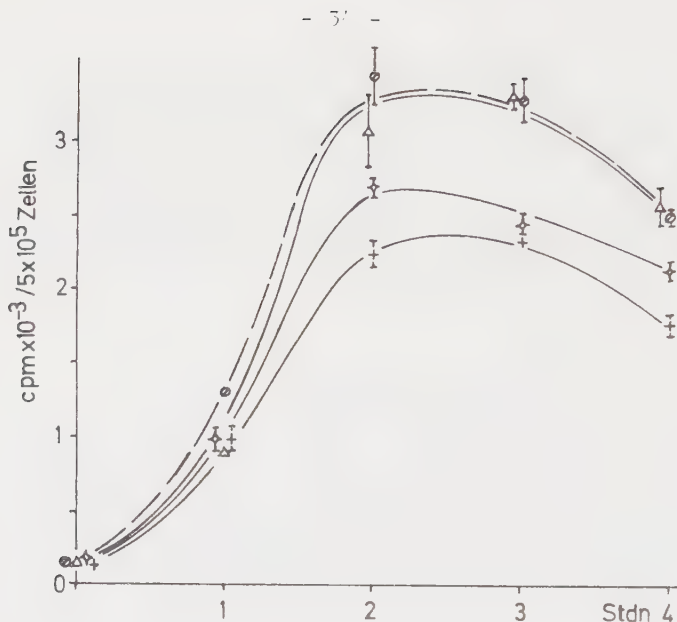


Abb. 18

Einbau von ^3H -Uridin ($1.5 \mu\text{Ci/ml}$) in neusynthetisierte RNA unter Einfluß verschiedener Bernsteinsäurekonzentrationen:

○ Kontrolle ohne Bernsteinsäure

Bernsteinsäure Δ $0.4 \mu\text{g/ml}$ (= $2 \mu\text{g Sil.h.s./ml}$)
 ◆ $20 \mu\text{g/ml}$ (= $100 \mu\text{g Sil.h.s./ml}$)
 + $80 \mu\text{g/ml}$ (= $400 \mu\text{g Sil.h.s./ml}$)

Bei Durchführung der in Abb. 18 skizzierten Versuche zeigte sich eine Hemmung der RNA-Synthese unter Einfluß höherer Dosen Bernsteinsäure (etwa $20 \mu\text{g/ml}$). Kleinere Dosen beeinflussten die Synthese jedoch nicht. Die Hemmwirkung großer Dosen Silybinhemisuccinat auf die RNA-Synthese wäre also eventuell auch durch den Einfluß des Succinatrestes zu erklären.

2.4.2. Glucamat

Ein weiteres viel verwendetes Derivat ist Silybinglucamat, das folgendem Dissoziationsgleichgewicht unterliegt:



Um festzustellen, ob auch das N-Methyl-glucosamin (Abb. 19) Eigenwirkungen auf die RNA-Synthese zeigt, wurden die Hepatocyten mit einer der stimulierenden Silybinhemisuccinatdosis von 3 µg/ml äquimolaren Menge N-Methylglucosamin (1.2 µg/ml) inkubiert (Abb. 20).

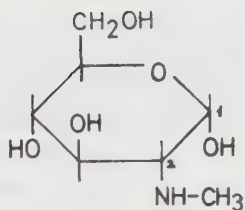


Abb. 19

Strukturformel von D(-)-N-Methyl-glucosamin

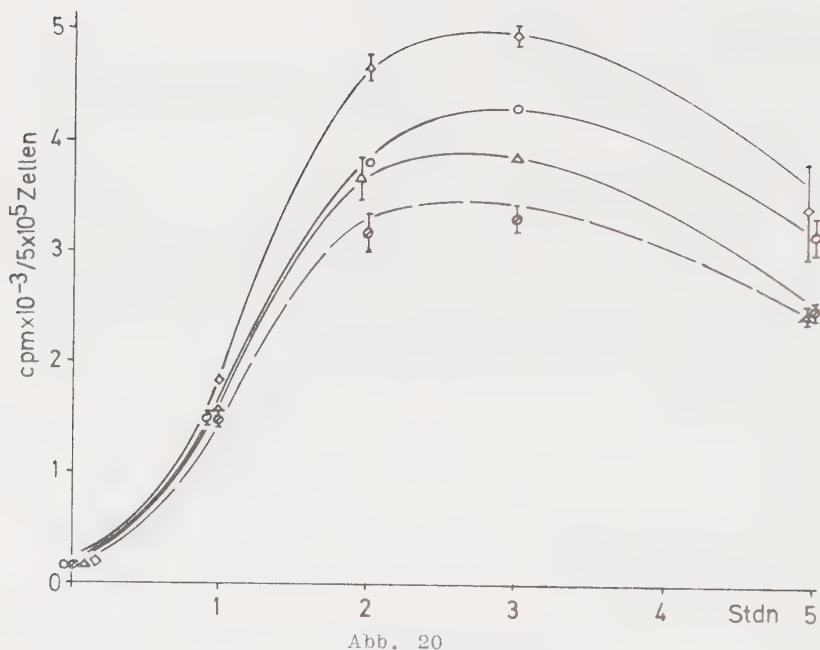


Abb. 20

Einbau von ^3H -Uridin ($1.5 \mu\text{Ci/ml}$) in neusynthetisierte RNA unter Einfluß der zu $2 \mu\text{g}$ Silybinhemisuccinat/ml äquimolaren Menge N-Methyl-glucosamin ($1.2 \mu\text{g/ml}$)

- | | |
|-----------------------|--|
| ○ Kontrolle | ○ Silybinhemisuccinat |
| Δ N-Methyl-glucosamin | ◇ Silybinhemisuccinat +
N-Methyl-glucosamin |

Die Einbauraten von radioaktiv markiertem Uridin in neusynthetisierte RNA war unter N-Methyl-glucosamin etwas erhöht. Die unter Einfluß des mit N-Methyl-glucosamin in Lösung gebrachten Silybins gemessenen RNA-Syntheseraten lagen auch höher als die unter Silybinhemisuccinateinfluß alleine. Damit zeigte sich mehrfach der durch Glucosamin bedingte RNA-synthesestimulierende Effekt. Die Gegenwart von Glucosamin war deshalb für das Studium der Silybinwirkung störend.

2.4.3. Freies Silybin

2.4.3.1. RNA-Synthesestimulierung durch Silybin in Suspension

Um die Beeinflußbarkeit der RNA-Synthese eindeutig mit der Struktur des Silybinmoleküls in Zusammenhang zu bringen, wurde die RNA-Synthese unter dem Einfluß von im Medium suspendierten Silybin untersucht, so daß ein Einfluß eines derivatisierenden Restes (-hemisuccinat oder -glucamat) ausgeschlossen werden konnte.

Obwohl Silybin nur schwer wasserlöslich ist, ergab sich eine UV-spektrometrisch (E 280) festgestellte Sättigungskonzentration von ca. 1.6 µg Silybin/ml neutralem Wasser. Diese Konzentration liegt in dem von Silybin-hemisuccinat bekannten RNA-synthesestimulierenden Konzentrationsbereich.

1 mg Silybin wurde in 10 ml Medium suspendiert und die Wasserstoffionenkonzentration auf pH 8 eingestellt. Nach 15 min unter leichtem Umschwenken wurde die Lösung filtriert, um eine im Verlauf der Inkubation unterschiedliche Nachlösung durch Phenolatbildung aus dem Bodensatz zu verhindern. Die gesättigte Silybinlösung wurde ohne Bodensatz auf die Inkubationsgefäße verteilt und die Hepatocyten sowie die Radioaktivität inkubiert (Abb. 21).

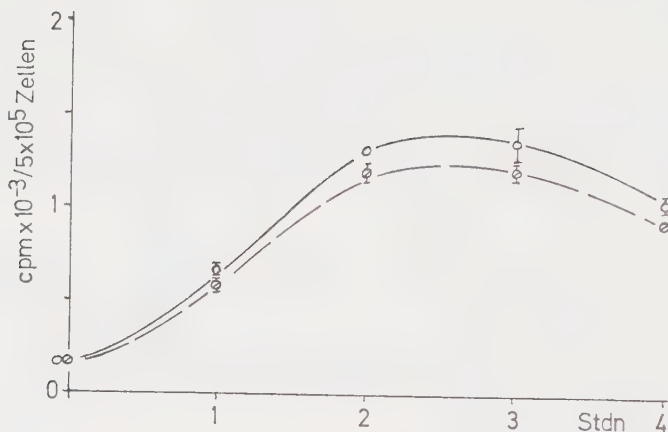


Abb. 21

RNA-Synthese unter Einfluß von Silybin in gesättigter Lösung
(ca. 2 µg/ml), 1 µCi ³H-Uridin/ml

○ Kontrolle

○ Silybin pH 8

Der Versuch mit nichtkonjugiertem Silybin (Abb. 21) bestätigt die schon mit Silybinhemisuccinat gefundene Stimulierung der RNA-Synthese durch eine Dosis von ca. 2 µg/ml. Dies bedeutet, daß die stimulatorische Wirkung auf das unverknüpfte Silybinmolekül zurückgeführt werden kann.

2.4.3.2. Beeinflussung der RNA-Synthese durch Silybin-Na

Wegen der konstanten Sättigungskonzentration des suspendierten Silybins in einem Dosisbereich, der nur die Stimulierung der RNA-Synthese hervorrief, konnte eine RNA-Synthese-hemmende Wirkung durch höhere Konzentrationen zunächst nicht untersucht werden. Der folgende Versuch wurde unternommen, um die hemmende Wirkung des Silybinmoleküls zu untersuchen. Das Silybin ist gegen 0.1n NaOH- oder Na_2CO_3 -Lösung alkaliunempfindlich (1,7) und kann darin in den erforderlichen Konzentrationen (über 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durch Phenolatbildung schnell in Lösung gebracht werden. Nach Einstellen der Wasserstoffionenkonzentration des Mediums auf pH 8 erreichte man für längere Zeit höhere Silybin-Na-Konzentrationen, deren Einfluß auf die RNA-Synthese getestet werden konnte. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 22 dargestellt.

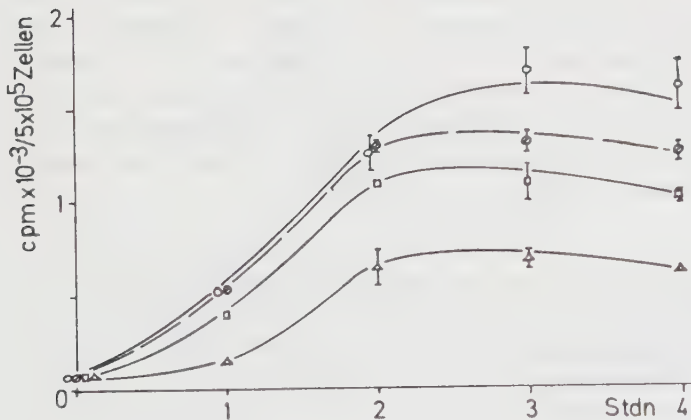


Abb. 22

RNA-Synthese unter Einfluß von Silybin-Na-phenolat in kleinen Dosen bei pH 8. 1 μCi ^3H -Uridin/ml

Kontrolle ●	Silybin-Na	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	○
	Silybin-Na	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	□
	Silybin-Na	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	△

Wie aus Abb. 22 wiederum ersichtlich wird, wurde die RNA-Synthese unter dem Einfluß von Silybin-Na-phenolat in kleinen Dosen unter 10 µg/ml stimuliert, unter dem Einfluß größerer Dosen (über 10 µg/ml) hingegen gehemmt. Die Hemmung der RNA-Synthese durch große Dosen Silybin-Na wird also durch das freie Silybinmolekül hervorgerufen.

Außerdem zeigte die RNA-Synthesebeeinflussung durch Silybin-Na (Abb. 22) den gleichen Verlauf wie bei Silybinhemisuccinat, d.h., das durch Bindung an Bernsteinsäure wasserlöslich gemachte Silybin zeigte ein identisches Verhalten wohl infolge schneller Esterspaltung in den Zellen. Es scheint daher für Untersuchungen der RNA-Synthesebeeinflussung durchaus geeignet.

3. Untersuchungen zur Wirksamkeit des Silybins

Wie MACHICAO und SONNENBICHLER (15) gezeigt haben, stimuliert Silybin die RNA-Synthese durch Erhöhung der Enzymaktivität der RNA-Polymerase A. Da die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen zell- und spezie-spezifische Eigenschaften besitzen (57), könnte angenommen werden, daß auch die Bindungsstelle von Silybin bei Polymerase A je nach Zelltyp mehr oder weniger "silybinaffin" ist.

Außerdem können, unabhängig von der Affinität des Silybins zur Bindungsstelle der Polymerase A, Eigenschaften der Zelle die Wirkungsspezifität des Silybins beeinflussen, so z.B. die zellspezifische Metabolisierung und der Transport des Silybins im Cytoplasma.

3.1. Stimuliert das Silybin die RNA-Synthese geschlechtsspezifisch ?

Zeitpunkt, Dauer und Rate der RNA-Synthese werden in der Zelle u.a. durch physiologische Effektoren beeinflusst.

Eine Möglichkeit, die Wirkungsweise des Silybins molekularbiologisch zu verstehen, ist die These, daß Silybin für die Polymerase A Effektoreigenschaften besitzt. Da Silybin für die Hepatocyten ein unphysiologischer Stoff ist, könnte angenommen werden, daß das Silybin in der Zelle die Funktionen eines ähnlich gebauten, physiologischen Effektors simuliert. Auch das Östrogen ist in der Lage, als Effektor die Enzymaktivität der Polymerase A und somit die RNA-Syntheserate zu erhöhen (58,59,60,61,62,63). Die effektorsimulierende Wirkung des Silybins auf die RNA-Synthese könnte sich daher in den durch Östrogen vorgeprägten Hepatocyten aus weiblichen Ratten anders darstellen.

Um zu überprüfen, ob eine Beeinflussung der RNA-Synthese durch Silybin in Leberzellen aus weiblichen Ratten anders als in Leberzellen aus männlichen Ratten verlaufen würde, wurden Hepatocyten aus Weibchen isoliert und bezüglich der Beeinflußbarkeit ihrer RNA-Synthese mit Zellen aus männlichen Ratten verglichen (Abb. 23):

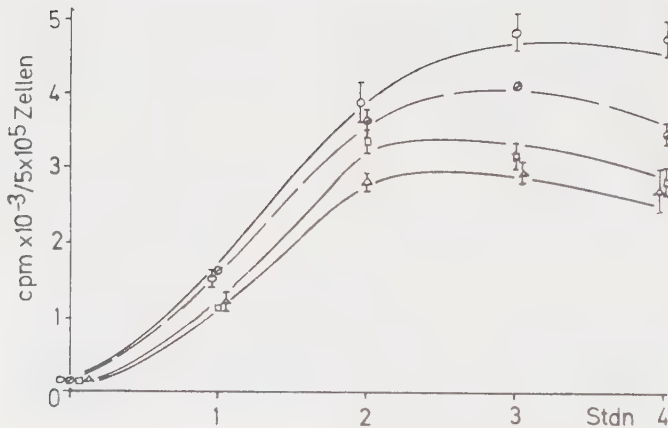


Abb. 23

Zeitabhängige RNA-Synthese bei Hepatocyten aus den Lebern weiblicher Ratten unter Einfluß verschiedener Dosen Silybin-Na, (vergl. Abschnitte 2.3.2. und 2.5.2., Abbildungen 16, 21 und 22). 2 µCi ³H-Uridin/ml.

- Kontrolle
- Silybinhemisuccinat 3 µg/ml
- Silybinhemisuccinat 15 µg/ml
- △ Silybinhemisuccinat 150 µg/ml

Die Einbauraten von ³H-Uridin in säureunlösliches Material wurden im Zeitraum von 3 Stunden bei Hepatocyten aus weiblichen Ratten durch kleine Silybinhemisuccinat-Dosen (3 µg/ml) gesteigert, durch höhere Dosen (über 10 µg/ml) inhibiert.

Im Vergleich mit der RNA-Synthese in Hepatocyten aus männlichen Ratten (Abb. 16, 21 und 22), waren die RNA-Syntheseraten in Hepatocyten weiblicher Ratten durch die Silybindosis in gleicher Weise beeinflusst. Somit scheint keine geschlechtsspezifische Beeinflussbarkeit der RNA-Synthese durch Silybin vorzuliegen.

3.2. Einfluß von Silybin auf die RNA-Synthese anderer eukaryontischer Zellen

Die RNA-synthesestimulierende Wirkung des Silybins wurde einerseits in Versuchen mit Rattenleber andererseits in Versuchen mit männlichen und weiblichen Hepatocyten gezeigt. Um zu untersuchen, ob Silybin die RNA-Synthese nur in Leberzellen, oder auch in anderen eukaryontischen Zellen stimuliert, d.h., ob das Silybin gewebsspezifisch wirkt, wurde die RNA-Synthese unter Silybineinfluß bei Zellen untersucht, die nicht aus Lebergewebe stammen. Hierzu dienten Raji-Zellen, eine lymphoblastoide Zell-Linie, die ursprünglich aus Burkitt's Lymphom stammt (64). Diese virustransformierten menschlichen Lymphocyten enthalten einige Kopien von Epstein-Barr-Virus im Genom. Dadurch erhalten sie die Fähigkeit, außerhalb des Organismus in Langzeitkulturen zu wachsen. (Die Raji-Zellen beinhalten das Virus nur, reproduzieren es aber nicht (65,66)).

Die Suspensionskultur, die jeweils immer nach acht Tagen halbiert und mit frischem Medium aufgefüllt wurde, hat nach dem Umsetzen zuerst eine exponentielle Wachstumsphase, wobei die Zellkonzentration von ca. 2×10^5 Zellen/ml bis ca. 8×10^5 Zellen/ml zunahm und zu diesem Zeitpunkt (nach etwa sechs Tagen) die stationäre Phase erreichte. Die Wachstumskurve der Raji-Zellkultur wurde durch Auftragen der durch Auszählen ermittelten Zellkonzentration gegen die Zeit dargestellt (Abb. 24).

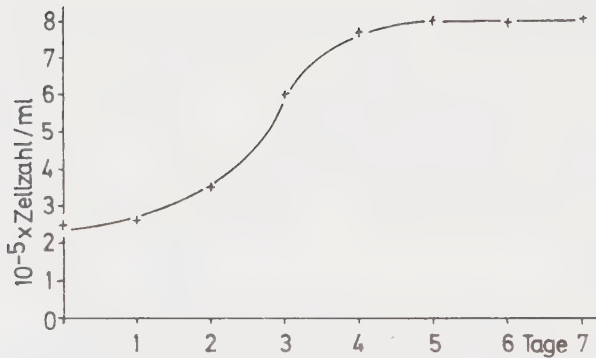


Abb. 24

Wachstumskurve einer Raji-Zellkultur in 100 ml RPMI-1640-Medium (Seromed)

Die RNA-Synthese wurde jeweils am 4. Tag, in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase der Raji-Zellkultur untersucht. Die zu diesem Zeitpunkt bestehende Zellkonzentration von ca. 2×10^5 Zellen/ml wurde für alle folgenden Versuche beibehalten.

Zunächst wurde die RNA-Synthese ohne Silybineinfluß zeitabhängig untersucht, um festzustellen, wann die Markierungsrate durch ^3H -Uridin für eine Beobachtung der Dosisabhängigkeit ausreicht (Abb. 24).

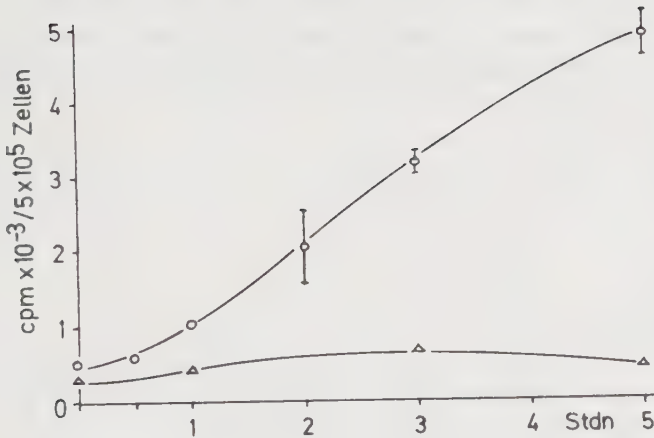


Abb. 25

Zeitabhängigkeit der RNA-Synthese ohne Silybin, 0.5 μCi
 ^3H -Uridin/ml

- Raji-Zellen unbeeinflusst
- △ Raji-Zellen unter Verwendung von 5 μg
Actinomycin D/ml zur Kontrolle der
Synthesetätigkeit

Die Markierungsrate der RNA wurde bis zu 10 Stunden verfolgt. Sie verlief zeitlich, wie in einer wachstumsfähigen Zellkultur zu erwarten war, kontinuierlich. Sie erreichte nach 3 bis 5 Stunden eine gut meßbare Höhe, so daß zu diesem Zeitpunkt die RNA-Synthese unter Einfluß verschiedener Dosen Silybin untersucht werden konnte.

Zur Messung der Dosisabhängigkeit der RNA-Synthese bei Raji-Zellen wurden Aliquots der Zellsuspension, die in Einzelgläsern mit radioaktiv markiertem Uridin und verschiedenen Kon-

zentrationen Silybinhemisuccinat in RPMI-Medium (Fa. Seromed) inkubiert worden waren, mit TCA gefällt, und der Uridineinbau in TCA-fällbares Material bestimmt. Abb. 26 zeigt den Einfluß von Silybinhemisuccinat in Konzentrationen über 100 µg/ml auf die RNA-Synthese nach 3 Stunden in Raji-Zellen.

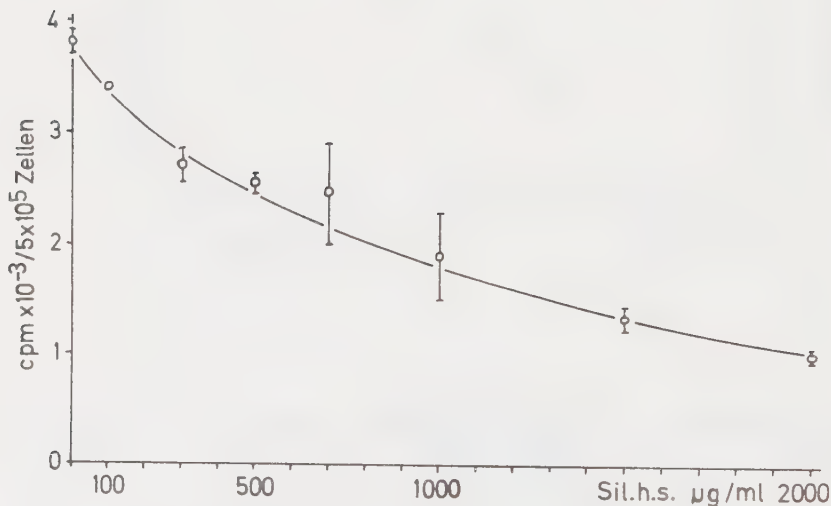


Abb. 26

Dosisabhängigkeit der RNA-Synthese von Raji-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase unter Einfluß von Silybinhemisuccinatkonzentrationen (über 100 µg/ml), 0.5 µCi ³H-Uridin/ml. Meßwerte nach 3 Stunden.

Die in Abb. 26 gezeigte Abhängigkeit der RNA-Synthese von hohen Silybindosen wurde auch für einen Dosisbereich unter 100 µg/ml untersucht und in Abb. 27 dargestellt.

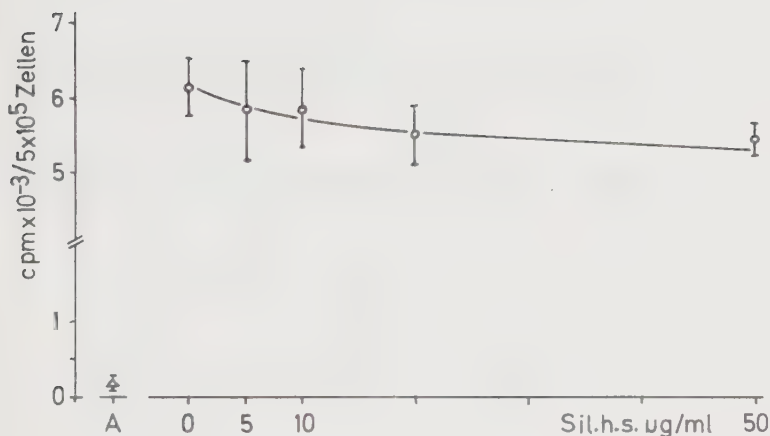


Abb. 27

Abhängigkeit der RNA-Synthese in Raji-Zellen von kleinen Dosen Silybin (unter $100 \mu\text{g/ml}$), $0.5 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Uridin/ml}$, Actinomycin-D $5 \mu\text{g/ml}$ zur Vitalitätskontrolle (16). Meßwerte nach 3 Stunden.

Wie aus Abb. 26 ersichtlich wird, wurden die Einbauraten von radioaktiv markiertem Uridin bei Raji-Zellen durch den Einfluß von Silybinhemisuccinat in Dosen über $100 \mu\text{g/ml}$ herabgesetzt. Auch Silybinhemisuccinatkonzentrationen unter $100 \mu\text{g/ml}$ reduzierten die Markierungsraten der neusynthetisierten RNA gegenüber der unbeeinflussten RNA-Synthese.

Im Vergleich zur RNA-Synthese bei Hepatocyten zeigte sich bei Raji-Zellen, daß durch hohe Dosen Silybinhemisuccinat die RNA-Synthese ebenfalls gehemmt wurde, was (vergl. Abschn. 2.3.2.) mit unspezifischen Wechselwirkungen des Silybins an der Zellmembran erklärt werden könnte (6).

Niedrige Konzentrationen (unter 10 $\mu\text{g/ml}$) Silybinhemisuccinat beeinflussten die RNA-Synthese jedoch nicht im Sinne einer Stimulierung.

Eine, die RNA-Synthese stimulierende Wirkung des Flavonolignan-derivats scheint also nicht bei allen eukaryontischen Zellen vorhanden zu sein.

Untersuchungen anderer Autoren haben pharmakologische Wirkungen von hohen Dosen Silybin, z.B. die Eigenschaft eines Giftstoffantagonisten, auch in anderen Geweben außer der Leber entdeckt. Bei Nierengewebe antagonisierte das Silybin die α -Amanitinintoxikation(67), bei Hirngewebe wurde eine anti-ödematöse Wirksamkeit des Silybins gefunden (68). Diese Effekte beruhen möglicherweise auf (unspezifischen) Wirkungen des Silybins an der Zellmembran. Da andererseits die RNA-Synthese in Raji-Zellen offenbar nicht stimuliert wird, aber bei Hepatocyten eine Stimulierung zu sehen ist, kann ein spezifischer Einfluß des Silybins auf die RNA-Synthese in Leberzellen festgestellt werden.

3.3. Struktur-Wirkungsbeziehung

TROST und HALBACH (69) hatten festgestellt, daß die Antiphallolidin- und die Anti- α -Amanitinwirkung des Silybins bei in-vivo-Versuchen nur durch das Silybinmolekül als ganzes erreicht wird, und daß die Partialstrukturen, Taxifolin und Coniferylalkohol, einzeln antihepatotoxisch unwirksam sind. Die Vermutung lag deshalb nahe, daß der zellspezifische Einfluß des Silybins auf die RNA-Synthese an die Struktur des Silybinmoleküls gebunden ist.

Im folgenden wurde versucht, eine Beziehung zwischen silybin-ähnlichen Strukturen und der Stimulierbarkeit der RNA-Synthese herzustellen (Tab. 7). Zu diesem Zweck wurde die RNA-Synthese unter Einfluß einer Reihe von Flavonoiden bei isolierten Rattenleberzellkernen in vitro analog früheren Versuchen von

MACHICAO und SONNENBICHLER (15,70) studiert. Dabei wurden 10^6 Zellkerne/ml in Synthesepuffer mit ^3H -UTP und Flavonoid inkubiert. Die RNA-Syntheserate wurde zu verschiedenen Zeiten durch den Einbau von radioaktivem Uridin in TCA-fällbares Material bestimmt (71,72,73). In Abb. 28 ist der Einfluß eines der untersuchten Flavonoide (Silybin) auf die RNA-Synthese in Rattenleberzellkernen dargestellt. Einem Teilansatz des Systems war α -Amanitin beigefügt worden, um die Synthesefähigkeit der Kern-Polymerasen zu kontrollieren (74):

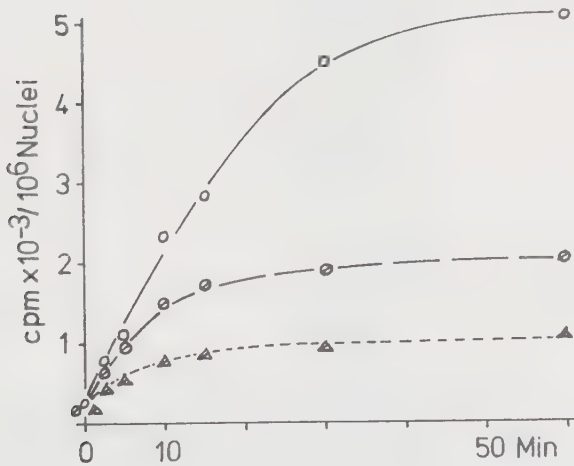


Abb. 28

Radioaktivität aus dem Einbau von ^3H -UTP (5 µCi/ml. Spez. Akt. 20 Ci/mM) in die RNA von Rattenleberzellkernen in vitro in Gegenwart von a) 50 µg Silybin/ml (○—) b) 20 µg α -Amanitin/ml (▲---) c) unbeeinflusste Kontrolle (○—)

Abb. 28 zeigt die Verminderung des Einbaus von ^3H -Uridintriphosphat (^3H -UTP) in die Kern-RNA durch α -Amanitin sowie die Stimulierung der Synthese von Kern-RNA durch Silybin.

Da der Umfang der vorliegenden Arbeit durch die Einzeldarstellung jeder Flavonoiduntersuchung in Form einer Kurve analog Abb. 28 übermäßig ausgedehnt würde, sind die Einflüsse der verschiedenen Flavonoide auf die RNA-Synthese in Rattenleberzellkernen summarisch in Tabelle 7 aufgeführt.

T a b e l l e 7

Effekt verschiedener Flavonoide (Konzentration 50 und 100 µg/ml) auf die rRNA-Synthese in isolierten Leberzellkernen in vitro. 10⁶ Kerne/ml, 0.5 µCi ³H-UTP/ml

+ = Stimulation	- = Inhibition	o = kein Effekt
<u>Flavanone</u>	Pinocembrin	o
	Isokurarinetin	o
	Homoerydityol	o
	Naringenin	o
	Hesperetin	+
	Flavanon	o
<u>Flavanonole</u>	Taxifolin	+
	Aromadendrin	o
<u>Flavone</u>	Acacetin	o
	Apigenin	o
	Aegicin	o
<u>Flavonole</u>	Gossypetin	(+)
	Galangin	o
	Morin	o
	Rhamnetin	o
	Quercetin	o
<u>Catechine</u>	Catechin	+
<u>Isoflavone</u>	Prunetin	o
	Iridigenin	+
	Genistein	-
<u>Flavonolignan</u>	Silybin	+
	Silychristin	o
	Silydianin	(+)
<u>Lignane</u>	Coniferylalkohol	o
<u>Andere</u>	Benzalacetophenon	o
	Chalkon	o
	Cynarin	o
	Curcumin	o

In isolierten Kernen wird die RNA-Synthese durch folgende Stoffe stimuliert:

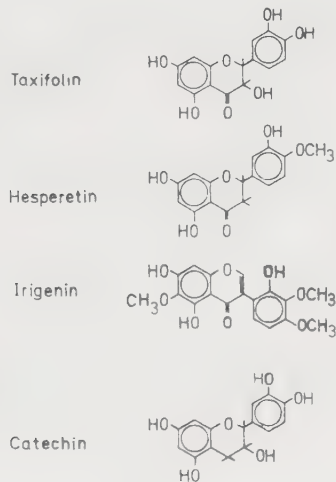


Abb. 29

Ausgehend von diesem Ergebnis wurde untersucht, ob die Flavonoide Hesperetin und Taxifolin und der Gerbstoff Catechin auch bei Hepatocyten die RNA-Synthese stimulieren würden. Die Hepatocyten wurden, wie in den vorangegangenen Versuchen zur RNA-Synthese, im Medium mit ^3H -Uridin und jeweils einem der oben genannten Stoffe inkubiert, die in der bekannten stimulierenden Dosis von $3\text{ }\mu\text{g}$ Silybinhemisuccinat/ml äquimolaren Konzentration vorlagen. In einem Zeitraum von 3 Stunden wurde die RNA-Syntheserate als TCA-fällbares Material gemessen (Abb. 30).

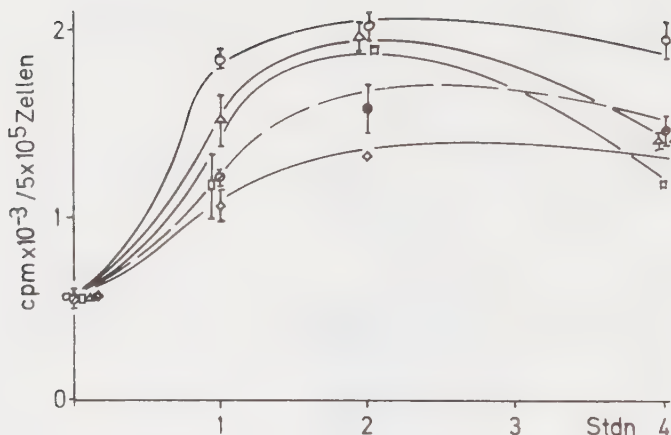


Abb. 30

RNA-Syntheseraten in Hepatocyten unter Einfluß von
 (○) 3 µg Silybin/ml, (△) 1.1 µg Taxifolin
 (□) 1.6 µg Hesperetin/ml und (◇) 1 µg Catechin/ml
 (●) unbeeinflusste Kontrolle. 1.5 µCi ³H-Uridin/ml.

Wie aus der graphischen Darstellung ersichtlich wird, wurde die Einbaurrate von ³H-Uridin in neusynthetisierte RNA außer durch Silybin in geringerem Maße auch durch die Flavonoide Hesperetin und Taxifolin erhöht, während der Gerbstoff Catechin keinen Effekt zeigte.

Die Moleküle von Taxifolin und Hesperetin sowie alle anderen in Tabelle 7 gezeigten Stoffe, die in den Versuchen mit Zellkernen zu einer Stimulierung der RNA-Synthese führten, haben außer Catechin, das in 4-Stellung reduziert ist und einen Gerbstoff darstellt, ein Flavongrundgerüst und tragen am Phenylrest in meta-Stellung OH-Gruppen und in para-Stellung kleine, sauerstoffgebundene Substituenten, z.B. Methylgruppen o.ä.

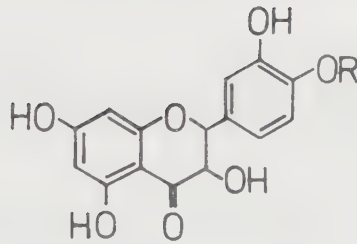


Abb. 31

Strukturformel des Flavongrundgerüstes mit der für die RNA-Synthesestimulierung wichtigen Anordnung von Substituenten am Phenylrest

Im Hepatocytensystem war hingegen eine Stimulierung der RNA-Synthese nur unter Einfluß von Taxifolin und Hesperetin feststellbar. Catechin schien hier seine im Kernsystem gezeigten synthesesestimulierenden Eigenschaften zu verlieren. Möglicherweise ist Catechin nicht in der Lage, die Zellmembran zu passieren. Zudem könnte es infolge seines Gerbstoffcharakters irreversibel an cytoplasmatische Proteine gebunden werden, so daß es nicht in den Kern vordringen kann. Da bei Hepatocyten auch die RNA-synthesestimulierende Wirkung von Taxifolin und Hesperetin geringer ist als die von Silybin, könnte eine geringere Affinität dieser Flavonoide zum Wirkort vermutet werden. Daneben könnten sie auch weniger gut in die

intakte Zelle aufgenommen werden oder im Cytoplasma einen Teil ihrer Wirksamkeit verlieren.

Für die RNA-Synthesestimulierung in der intakten Leberzelle scheint daher die Struktur des Silybins relativ spezifisch zu sein.

4. Einfluß des Silybins auf die RNA-Synthese in galaktosamin-geschädigten Rattenlebern

Die Verwendung von Silybin als Lebertherapeutikum (75,76,77), sowie die Ergebnisse pharmakologischer Testreihen, in denen auf die antihepatotoxischen Eigenschaften des Silybins verwiesen wurde (11,12,47,78), kann wahrscheinlich zum großen Teil mit einer durch Silybin bedingten schnelleren Regenerierung der Leberzellen erklärt werden. Grundlage dieser erhöhten Regenerationsvorgänge ist möglicherweise die gesteigerte RNA-Synthese.

Es schien daher interessant, den Einfluß von Silybin auf die RNA-Synthese bei geschädigten Hepatocyten zu prüfen.

Als Beispiel für einen Leberschaden wurde die Schädigung durch D-Galaktosamin gewählt (9,79,80,81). Die durch DGalN hervorgerufene künstliche Hepatitis ist histologisch dem Bild einer Hepatitis beim Menschen ähnlich (9,79,80,81).

DGalN greift nur die Leber an. Es erzeugt keine Veränderung an anderen Organen. Die Größe des Schadens ist durch die Dosis wählbar und nach in vivo-Gabe erkennbar am Glycogenverlust, am Anstieg von Enzymaktivitäten und einem erhöhten Bilirubinspiegel im Blutplasma. 30 min nach i.p. Gabe von 35 mg D-GalN/100 g Kgw. setzt ein starker Abfall des Lebergehalts an UTP, UDP, UMP und anderen Uridinmetaboliten ein.

Da die RNA-Synthese durch DGalN gehemmt wird (82,83), kann sie damit als Meßgröße des Leberschadens dienen. Die RNA-Synthesehemmung durch DGalN war von SHINOZUKA (81) bei Versuchen mit Ratten und Hepatocyten nur in vivo festgestellt worden, während HOFMANN (83) auch bei Hepatocyten, die aus

DGalN-behandelten Ratten entnommen worden waren, eine Hemmung der RNA-Synthese festgestellt hatte. Aufgrund der Befunde von HOFMANN, daß der DGalN-Schaden auch bei Hepatocyten feststellbar sei, wurde untersucht, ob die durch DGalN gehemmte RNA-Synthese bei Hepatocyten durch den Einfluß von Silybin wieder normalisiert werden könnte.

In Versuchstieren wurde durch i.p.-Injektion von DGalN eine künstliche Hepatitis erzeugt. Nach 24 Stunden wurde die Leber entnommen und die Hepatocyten isoliert. Hierauf wurden die Hepatocyten, wie bei den vorhergehenden Versuchen, im Medium mit und ohne Silybinhemisuccinat inkubiert und die RNA-Syntheserate der Zellen als Einbau der Radioaktivität in TCA-fällbares Material bestimmt (Abb. 32).

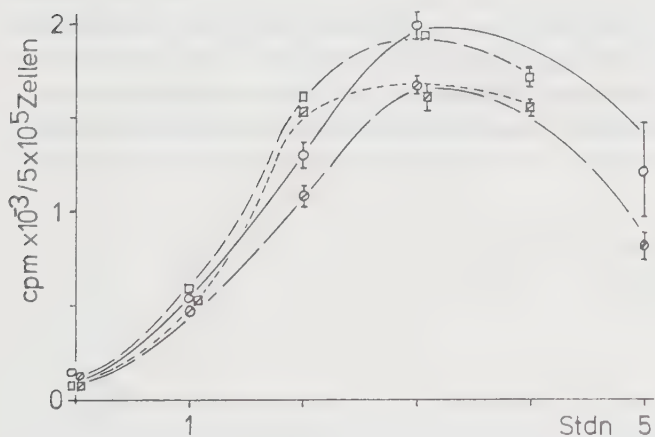


Abb. 32

RNA-Synthese in Hepatocyten 24 Stunden nach Injektion von 35 mg DGalN/100 g Ratte; ohne (○—) und mit (○——) Einfluß von 3 µg Silybinhemisuccinat/ml, 1.5 µCi ³H-Uridin/ml. RNA-Synthese in Hepatocyten aus gesunden Ratten ohne (□---) und mit (□——) Einfluß von Silybin (Vergl. Abb. 16, 21 und 22).

Es zeigte sich, daß sich die RNA-Syntheseraten bei DGalN-geschädigten Hepatocyten (Abb. 32) nicht wesentlich von denen in normalen Zellen (Abb. 16, 21 und 22) unterschieden. Die durch Silybinhemisuccinat beeinflusste RNA-Syntheserate war bei den DGalN-geschädigten Hepatocyten in etwa gleichem Maße gesteigert wie bei normalen Zellen. Im Hepatocytensystem konnte also eine Hemmung der RNA-Synthese durch DGalN nicht festgestellt werden.

Dieses Ergebnis ist bezüglich der oben zitierten kontroversen Ergebnisse von HOFMANN und SHINOZUKA interessant, da die Feststellung von SHINOZUKA bestätigt wurde, daß die Hepatocyten eine durch in-vivo-Behandlung mit DGalN erwartete RNA-Synthesehemmung nicht zeigen. Der Grund hierfür ist wohl, daß eine durch DGalN erzeugte RNA-Synthesehemmung durch das im Medium vorhandene Uridin wieder rückgängig gemacht wird (84).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß die Silybinwirkung auf die RNA-Synthese in Hepatocyten aus galaktosamin-geschädigten Rattenlebern nicht sichtbar war. Auf eine Darstellung der RNA-Synthese bei galaktosamingeschädigten Ganztieren wurde verzichtet, da die Daten wegen der individuellen Unterschiede nur schwer vergleichbar sind.

1. Beeinflussung der Proteinbiosynthese bei Hepatocyten

Die RNA der Ribosomen aus der Leber silybinbehandelter Ratten wies, wie oben gezeigt worden war, eine erhöhte spezifische Radioaktivität auf. Dies war auf eine, unter Silybineinfluß, stimulierte rRNA-Synthese und vermehrte Ribosomensynthese zurückgeführt worden.

Die biochemische Reaktionsfolge der RNA-Synthese ist die Proteinsynthese. Daher liegt die Vermutung nahe, daß im Anschluß an eine erhöhte Ribosomensynthese auch eine erhöhte Proteinbiosynthese stattfindet.

In den folgenden Versuchen wird der Einfluß des Silybins auf die Proteinbiosynthese untersucht.

1.1. Leucinaufnahme in die Zellen

Das im zweiten Abschnitt beschriebene System der Verwendung suspendierter Hepatocyten wurde zunächst auch zur Untersuchung der Proteinbiosynthese angewandt, da es zur Feststellung der Zeit- und Dosisabhängigkeit erforderlich war, eine Anzahl homogener Proben zu verschiedenen Zeiten dem System entnehmen zu können.

Die Proteinbiosynthese wurde mittels radioaktiv markiertem Leucin verfolgt, da Leucin eine in Proteinen häufig auftretende Aminosäure ist, die auch in Leberzellen nur in sehr geringen Raten zu anderen Stoffen metabolisiert wird (85).

Man markiert mit ^{14}C , um einen stärker radioaktiven Vorläufer einzusetzen, der in Konkurrenz mit 20 weiteren Aminosäuren weniger dicht in Protein eingebaut wird, als z.B. ^3H -Uridin in RNA.

Neben einer Anzahl anderer Vorbedingungen, wie z.B. einer vorangegangenen RNA-Synthese und einem intakten ribosomalen Syntheseapparat ist auch die Aminosäure-Aufnahme der Zelle ein regulierender Faktor für die Proteinbiosynthese (86). Es schien daher wichtig, zu untersuchen, ob die

Membranpermeabilität von Leucin bei Hepatocyten durch Silybin in kleinen und großen Dosen ähnlich beeinflußt würde, wie die Uridinaufnahme zur RNA-Synthese (vergl. Abschn. 2.).

Da im folgenden Experiment nur die Wirkung des Silybins hinsichtlich der Permeation der Aminosäure durch die Zellmembran interessierte, wurden die für die Proteinsynthese verfügbaren intrazellulären kompartimentierten Aminosäurepools (87,88,89) nicht im einzelnen bestimmt, sondern lediglich die Gesamtleucinaufnahme in silybin-behandelten und unbehandelten Hepatocyten verglichen.

Die Hepatocyten wurden im Vollmedium mit ^{14}C -Leucin suspendiert (38,39). Die ^{14}C -Leucinaufnahme der Hepatocyten wurde zeitabhängig unter Einfluß einer großen (300 $\mu\text{g/ml}$) und einer kleinen (2 $\mu\text{g/ml}$) Silybinhemisuccinatdosis nach Waschen der Zellen als säurelösliche Radioaktivität im Überstand der TCA-gefällten hochmolekularen Zellbestandteile bestimmt (Abb. 33, 34).

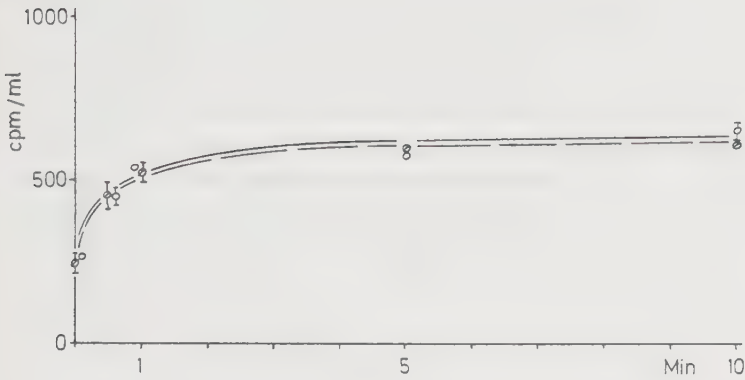


Abb. 33

Leucinaufnahme ($1 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Leucin/ml) in Hepatocyten ohne (○—) und mit (●—) Einfluß von $300 \mu\text{g}$ Silybinhemisuccinat/ml.

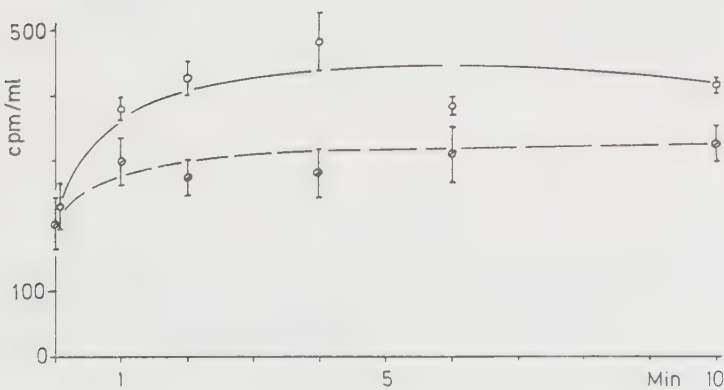


Abb. 34

Leucinaufnahme ($1 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Leucin/ml) in Hepatocyten ohne (○—) und mit (●—) Einfluß von $2 \mu\text{g}$ Silybinhemisuccinat/ml.

Die Daten aus Abb. 33 zeigen, daß die TCA-lösliche Radioaktivität aus Hepatocyten unter Einfluß einer hohen Silybinhemisuccinatdosis (300 µg/ml) nicht von der aus unbehandelten Zellen abweicht. Damit scheint die Leucinaufnahme mit und ohne Silybinhemisuccinateinfluß gleich hoch zu sein. Die gewählte Silybinhemisuccinatdosis, die, wie in Abb. 9 und Abb. 13 gezeigt wurde, die Uridinaufnahme und die RNA-Synthese hemmen würde, beeinflusste also die Aufnahme der Aminosäure offensichtlich nicht. Dagegen ist aus den Werten der Abb. 34 eine Vermehrung der TCA-löslichen Radioaktivität in den Hepatocyten unter Einfluß einer kleinen Dosis Silybinhemisuccinat (2 µg/ml) abzulesen. Unter Einfluß dieser kleinen Silybinhemisuccinatdosis, die die RNA-Synthese stimulierte (vergl. Abschnitte 2.1. und 2.3.) nahmen die Hepatocyten also ebenfalls mehr Aminosäure auf. Wie später gezeigt wird, stimulieren kleine SHS-Konzentrationen die Proteinbiosynthese in Leberzellen. Die vermehrte Aufnahme von ^{14}C -Leucin könnte als Folge dieser erhöhten Proteinbiosynthese zustande kommen. Diese Annahme wird damit begründet, daß die Leucinaufnahme in Hepatocyten durch eine Dosis von 300 µg/ml weder erhöht noch herabgesetzt wird, und eine Wirkung nur kleiner Konzentrationen auf die Membranpermeabilität daher unwahrscheinlich ist. Ein gesteigerter Verbrauch von ^{14}C -Leucin würde aber sicher einen erhöhten Einstrom von ^{14}C -Leucin bewirken.

2. Abhängigkeit der Proteinbiosynthese von der Silybindosis

Um festzustellen, ob Silybin die Proteinbiosynthese beeinflusst, wurden die suspendierten Hepatocyten mit ^{14}C -Leucin und zunächst mit der oben erwähnten hohen Dosis (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silybin in Form des Hemisuccinats inkubiert. Die Proteinsyntheserate wurde zu verschiedenen Zeiten als nicht hydrolisierbare TCA-unlösliche Fällung der hochmolekularen Zellbestandteile aus gewaschenen Zellen bestimmt (43).

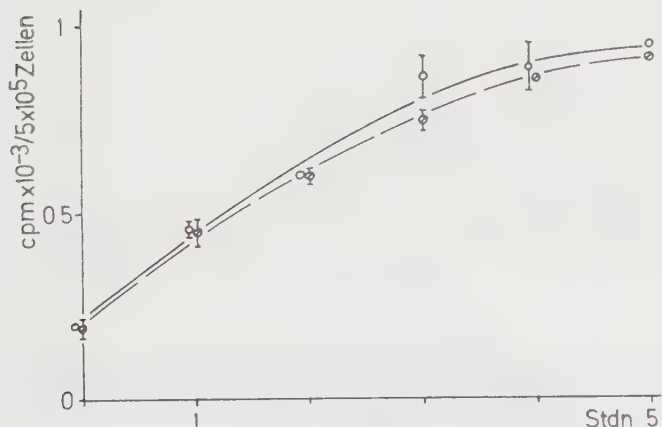


Abb. 35

Zeitabhängiger Einbau von ^{14}C -Leucin (3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) in neusynthetisiertes Protein bei Hepatocyten ohne (O—) und mit (O—) Einfluß von 300 μg Silybinhemisuccinat/ml.

In einem zweiten Versuch wurde die Wirkung einer kleinen Dosis (2 $\mu\text{g/ml}$) Silybinhemisuccinat auf die Proteinsynthese unter denselben Versuchsbedingungen untersucht.

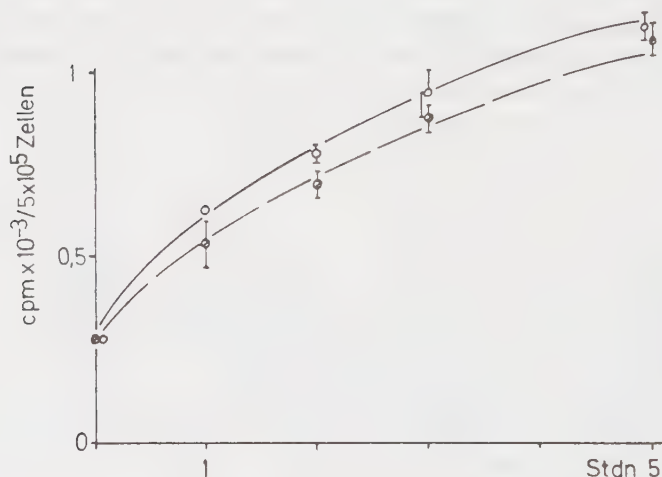


Abb. 36

Zeitabhängige Proteinsynthese in Hepatocyten ohne (●—) und mit (O—) Einfluß von 2 μg Silybinhemisuccinat/ml. 3 μCi ^{14}C -Leucin/ml.

Die Meßwerte in Abb. 35 zeigen gleiche Einbauraten von ^{14}C -Leucin für die Proteinsynthese in silybinbehandelten und unbehandelten Hepatocyten. Somit besteht kein Unterschied in der Proteinsynthese unter Einfluß der hohen Dosis (300 $\mu\text{g/ml}$) Silybinhemisuccinat im Vergleich zur Proteinsynthese in unbeeinflussten Hepatocyten, obwohl diese Silybinhemisuccinat-konzentration eine RNA-Synthese hemmen würde.

Unter Einfluß der kleinen (2 $\mu\text{g/ml}$) Silybinhemisuccinatdosen ist die Proteinbiosynthese in Hepatocyten gesteigert. Jedoch

zeigten die Einbauraten von ^{14}C -Leucin in neusynthetisierte Proteine bei Hepatocyten mit und ohne Einfluß von Silybin-hemisuccinat nur relativ geringe Unterschiede. Die geringe sichtbare Steigerungsrate der Proteinsynthese in Hepatocyten unter Einfluß der kleinen Silybinhemisuccinatdosis könnte aber mit der Abgabe von neusynthetisierten Proteinen ins Medium erklärt werden (60,94,95,96). Der Anteil der ins Medium sezernierten Proteine wurde bei der Säurefällung der gewaschenen Hepatocyten nicht mitgemessen.

Eine Fällung der Proteine im Medium, wo noch unverbrauchtes ^{14}C -Leucin vorliegt, führte offensichtlich wegen unspezifischer Adsorptionen der freien radioaktiven Vorstufe mit hochmolekularen Bestandteilen zu keinen befriedigenden Ergebnissen.

Die Tatsache, daß die Proteinsynthese in Hepatocyten unter Einfluß hoher Silybinhemisuccinatdosen trotz Hemmung der Synthese von neuer RNA mit konstantem Ribosomenbestand unvermindert weiterlief, spricht dafür, daß das Silybin die Proteinbiosynthese nicht direkt auf der Stoffwechselebene der Translation beeinflusst. Die Steigerung der Proteinbiosynthese unter Einfluß kleiner Silybinhemisuccinatdosen, - wenn auch nur in der Tendenz einer Stimulierung zu sehen, - dürfte als Folge einer durch Silybin stimulierten Transkriptionsrate zustandekommen.

2. Beeinflussung der Proteinbiosynthese bei Rattenlebern

In den folgenden Experimenten wurde versucht, den Einfluß des Silybins auf die Proteinsynthese in vivo zu klären.

2.1. Leucinaufnahme in die Leber

Wieder wurde zuerst geprüft, ob und wie die Aminosäureaufnahme (86) in der Rattenleber durch Silybin beeinflusst wird. Nach einer in vivo-Applikation von ^{14}C -Leucin und Silybin in Form des wasserlöslichen Hemisuccinats, wurde behandelten und unbehandelten Versuchstieren die Leber entnommen, ge-

waschen und nach Auflösung von Leber- und Blutproben in Protosol die aufgenommene Menge der Aminosäure als Gesamtradioaktivität bestimmt (Abb. 37).

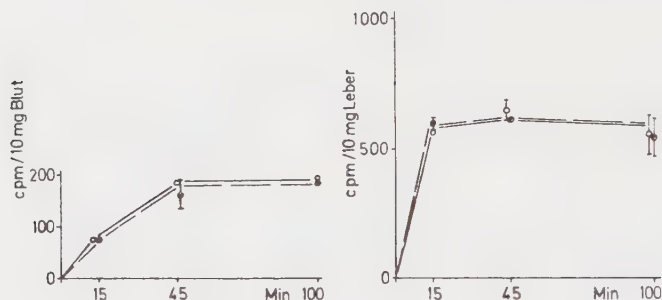


Abb. 37

Aminosäureaufnahme bei der Ratte in Leber und Blut nach i.p.-Injektion von 10 μCi ^{14}C -Leucin/Ratte (180 g) bzw. 20 mg Silybinhemisuccinat/Ratte. Lösungsmittel 100 μl 0.9% NaCl.

● Kontrolle ohne Silybinhemisuccinat

○ mit Silybinhemisuccinat behandelt

Die Radioaktivität der Aliquots aus Blut und Leber stieg in den ersten 15 min stark an, wobei die Meßwerte der Leberproben um das dreifache höher lagen als die entsprechenden Werte aus dem Blut. Während die Radioaktivität im Blut infolge Aufnahme von ^{14}C -Leucin aus dem Bauchraum nach 15 min immer noch etwas anstieg, änderte sie sich in der Leber

bis zum Ende des Versuches (nach 100 min) nicht mehr, d.h. in der Leber war nach 15 min ein Gleichgewichtszustand an aufgenommenem Leucin erreicht.

In Abschnitt 1 war bereits gezeigt worden, daß die Orotsäureaufnahme bei in-vivo-Versuchen unter gleichzeitiger Applikation von 20 mg Silybinhemisuccinat gesteigert wurde. Dieselbe Silybinhemisuccinatdosis wurde auch jetzt zur Beeinflussung der Leucinaufnahme angewandt.

Ein Vergleich der Leucinaufnahme in Leber und Blut von silybinbehandelten und unbehandelten Ratten zeigte jedoch keinen Unterschied. Durch eine gleichzeitig mit dem Leucin i.p. injizierte Dosis von 20 mg Silybinhemisuccinat pro 150 g Ratte wurde also weder die Aufnahme der Aminosäure ins Blut, noch die Aufnahme in die Leber beeinflußt.

Diese Tatsache deutet, wie schon in Abschnitt 1.1. vermutet wurde, darauf hin, daß das Silybinhemisuccinat die Membranpermeabilität für die Aminosäure nicht verändert.

2.2. Proteinbiosynthese bei gesunden Ratten

Da die Anwendung von Silybin einerseits kein Hindernis für die Aminosäureaufnahme darstellte, andererseits aber unter Einfluß von Silybin eine erhöhte RNA-Synthese in vivo festgestellt werden konnte (Abschn. 1.), lag die Möglichkeit nahe, daß in vivo auch eine erhöhte Proteinsynthese stattfinden würde.

Ein Vergleich der Proteinsynthese mit und ohne Silybineinfluß wurde zunächst bei gesunden männlichen Ratten durchgeführt, die ein Körpergewicht von ca. 180 g und damit annähernd gleich große Lebern besaßen.

Wegen der im Tierexperiment auftretenden individuellen Syntheseschwankungen wurde die Proteinsynthese an zwei Gruppen von jeweils 6 Ratten mit und ohne Silybinbehandlung ver-

glichen. Jedes Tier beider Gruppen erhielt pro 100 g Kgw. 10 μCi ^{14}C -Leucin i.p. in 200 μl 0.9%iger NaCl injiziert. Die Tiere der "Silybingruppe" erhielten jeweils 1 mg Silybinhemisuccinat/100 g Kgw., eine Dosierung, die, wie in Abschnitt 1 beschrieben wurde, zur Stimulierung der ribosomalen RNS-Synthese in vivo geföhrt hatte. Drei bis vier Stunden nach der Injektion von ^{14}C -Leucin bzw. Silybinhemisuccinat wurde den Tieren die Leber entnommen. Die Proteinsyntheserate konnte durch Fällung der, mit ^{14}C -Leucin markierten, hochmolekularen Zellbestandteile mit TCA aus dem Leberhomogenat bestimmt werden. Daraufhin folgte die statistische Bearbeitung der Meßwerte beider Gruppen. Die Gewichte der Rattenlebern schwankten um durchschnittlich 12%.

Die relativen Werte der mit Säure fällbaren Radioaktivität aus dem Leberhomogenat, wurden auf 10 mg Leber bezogen, die Proteinsyntheseraten der unbehandelten Kontrollgruppe wurden gleich 100% gesetzt und die Syntheserate der silybin-behandelten Gruppe darauf bezogen (Tabelle 6).

T a b e l l e 6

Relative Proteinsyntheseraten in unbehandelten und mit Silybin behandelten Ratten in vivo (1 mg Silybinhemisuccinat/100 g Kgw., 12 μCi ^{14}C -Leucin/Ratte mit ca. 150 g) nach durchschnittlich 3 Stunden

Versuchsnummer des Rattenpaares	Kontrolle	silybin- behandelt
1	100	132
2	100	111
3	100	109
4	100	173
5	100	(226)
6	100	169

Aus den Daten der Tabelle 6 errechnet sich für die Gruppe der silybinbehandelten Tiere ein Mittelwert der relativen Proteinsynthese von

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = 138$$

und eine Standardabweichung (Fehlergrenze) von

$$s = \frac{\sqrt{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}}{n - 1} = 22.5\%$$

In der Gruppe der silybinbehandelten Ratten lag ein Meßwert oberhalb der Fehlergrenze.

Aus Tabelle 6 ist zu sehen, daß die Proteinsyntheserate unter Silybineinfluß in jedem individuellen Versuch deutlich erhöht ist und daß die durchschnittliche Proteinsyntheserate bei Ratten unter Silybineinfluß höher liegt, als die der unbehandelten Kontrolltiere. Das Silybin ist also in der Lage, die Proteinbiosynthese in Rattenlebergewebe in vivo zu steigern. Durch dieses Ergebnis konnte der schon in Abschnitt 1.2 vermutete proteinsynthesesteigernde Effekt des Silybins bestätigt werden (Abb. 36).

2.3. Proteinbiosynthese bei galaktosamingeschädigten Ratten

In Abschnitt 4 war bereits versucht worden, mittels der Hepatocyten aus der Leber einer, nach Galaktosamingabe hepatischen Ratte, zu studieren, ob das Silybin die gehemmte RNA-Synthese normalisieren würde. Das Hepatocytensystem eignete sich jedoch nicht für die Untersuchung der RNA-Synthese bei einem Galaktosaminschaden der Leber (vergl. Abschnitt II.A.4.). In der galaktosamingeschädigten Leber ist aber gleichzeitig auch die Proteinsynthese gehemmt (82,97,83), die, obwohl unspezifisch, wahrscheinlich nicht nur über eine gehemmte RNA-Synthese, sondern auch direkt von DGalN beeinflusst wird (84). Deshalb wurde in vivo untersucht, ob die DGalN Schädigung der Proteinsynthese in der Leber durch Einfluß von Silybin kompensiert werden kann.

Wiederum wurden (wie im Abschn. 2.2.) die Proteinsyntheseraten verschieden behandelter Tiere verglichen. Einer Kontrollgruppe gesunder, unbehandelter Tiere, denen nur ^{14}C -Leucin ($10 \mu\text{Ci}/100 \text{ g Kgw.}$) appliziert wurde, um die normale Proteinsynthese zu kontrollieren, standen drei Gruppen hepatitischer Ratten gegenüber, die jeweils $3.5 \text{ mg DGalN}/100 \text{ g Kgw.}$ drei Stunden vor der Applikation der Aminosäure erhalten hatten. Von diesen wurde eine Gruppe nicht weiterbehandelt und diente als Kontrolle der durch DGalN gehemmten Proteinsynthese. Die beiden anderen hepatitischen Kollektive erhielten einmal gleichzeitig mit DGalN (prophylaktisch) und einmal ca. 2 Stunden später ("curativ") $1 \text{ mg Silybinhemisuccinat}$ pro 100 g Kgw. i.p. injiziert. Die Proteinsyntheseraten wurden als TCA-unlösliche Radioaktivität von Aliquots der Leberhomogenate bestimmt. Die, in Tabelle 7 aufgeführten Durchschnittswerte wurden als relative Einbauraten auf 10 mg Lebergewicht und auf eine gleich 100 gesetzte Kontrolle (unbeeinflusste Proteinsynthese) bezogen.

T a b e l l e 7

Durchschnittliche Proteinbiosyntheseraten mit und ohne Silybineinfluß bei gesunden und DGalN-geschädigten Ratten

unbeeinflusste Proteinsynthese in gesunden Ratten	Proteinsynthese in DGalN ge- schädigten Ratten		
	ohne Silybin	mit Silybin von Anfang an (prophylak- tisch)	mit Silybin- gabe nach ca. 2 Stunden (curativ)
100	$60 \pm 20\%$	$119 \pm 20\%$	$104 \pm 10\%$

Die relativen Proteinsyntheseraten waren in DGalN-geschädigten Ratten gegenüber der Proteinsyntheserate in gesunden Ratten stark vermindert. Durch prophylaktische und curative Silybinhemisuccinat-Applikation wurde die Proteinsynthese bis zum Normalwert regeneriert.

In Abb. 38 sind noch einmal die Ergebnisse aus Tabelle 6 und 7 veranschaulicht:

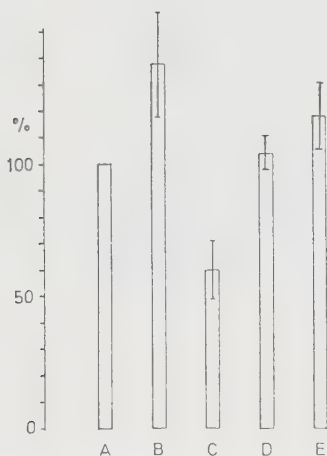


Abb. 38

Histogramm der relativen Proteinsyntheseraten in verschiedenen behandelten Ratten:

- A = gesund, unbehandelt ($12 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}\text{-Leucin/Ratte}$)
- B = gesund + Silybinhemisuccinat (1 mg/100 g Kgw., 2 Stdn.)
- C = DGalN-geschädigt (3.5 mg/100 g Kgw., 2 Stdn.)
- D = C + Silybinhemisuccinat nach 2 Stdn.
- E = C + Silybinhemisuccinat gleichzeitig

Das Histogramm (Abb. 38) verdeutlicht, daß unter Einfluß von Silybin die Proteinbiosyntheserate in gesunden Ratten erheblich gesteigert wurde. In Ratten mit künstlich erzeugter Hepatitis konnte die durch DGalN deutlich gehemmte Proteinsynthese nach Silybingabe sogar bis auf normale Werte angehoben werden.

Da die Proteinsynthese Voraussetzung für die Regenerierung eines Leberschadens ist (98,99,100), könnte die proteinsynthesesteigernde Wirkung des Silybins auch eine insgesamt erhöhte Regenerationsbereitschaft des Lebergewebes zur Folge haben.

Die Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung der Proteinbiosynthese durch Silybin (Abschnitte 1., 2.) lassen somit auch den therapeutischen Einsatz von Silybin als sinnvoll erscheinen.

3. Untersuchungen zur Spezifität der Proteinsynthesestimulierung

Die Tatsache, daß das Flavonolignan Silybin die RNA- und Proteinsynthese steigert, d.h. offensichtlich Regulationsvorgänge in der Zelle bei Transkription und Translation beeinflußt, könnte verschiedene Alternativen beinhalten:

Zum einen könnte das Silybin, ausgehend von der Aktivierung der Polymerase A und einer generellen Anhebung der Ribosomensynthese, eine allgemeine Aktivierung des Translationsapparates bewirken. Dies würde eine allgemein gesteigerte Proteinsynthese zur Folge haben.

Eine andere Möglichkeit wäre die vermehrte Synthese spezieller Proteine. In diesem Falle würde das Silybin die Exprimierung von normalerweise nicht oder nur wenig transkribierten Genen stimulieren. Vor allem muß aber damit gerechnet werden, daß die Synthesestimulierung bei jenen Proteinen, die einem schnellen turn-over unterliegen, zum Ausdruck kommt.

Um über die Spezifität der Proteinsynthesestimulierung durch Silybin Aufschlüsse zu gewinnen, wurden die elektrophoretischen Analysen der synthetisierten Proteingemische aus der Leber unbehandelter und mit Silybin behandelter Ratten miteinander verglichen. Die aus den Leberhomogenaten von unbehandelten und mit Silybin behandelten Ratten extrahierten radioaktiv markierten Gesamtproteine wurden elektrophoretisch analysiert.

Im Falle der allgemeinen Synthesestimulierung durch Silybin müßte das gesamte elektrophoretische Proteinmuster verstärkt radioaktiv markiert sein. Bei einer Bevorzugung bestimmter Polypeptidsynthesen nach Silybingabe sollten dagegen entweder zusätzliche Banden in der Elektrophorese erscheinen oder spezielle Banden innerhalb der vorhandenen durch erhöhte radioaktive Markierung besonders hervorgehoben sein. Da vermutet wurde, daß das verstärkte Auftreten aller oder einzelner Proteine schon bei elektrophoretisch separierten Proteingruppen sichtbar wäre, wurden die Proteine eindimensional auf einem SDS-Gel nach O'FARRELL (101) aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Coomassie-Färbung und ihre radioaktive Markierung fluorographisch (102, 103) sichtbar gemacht (Abb. 39).

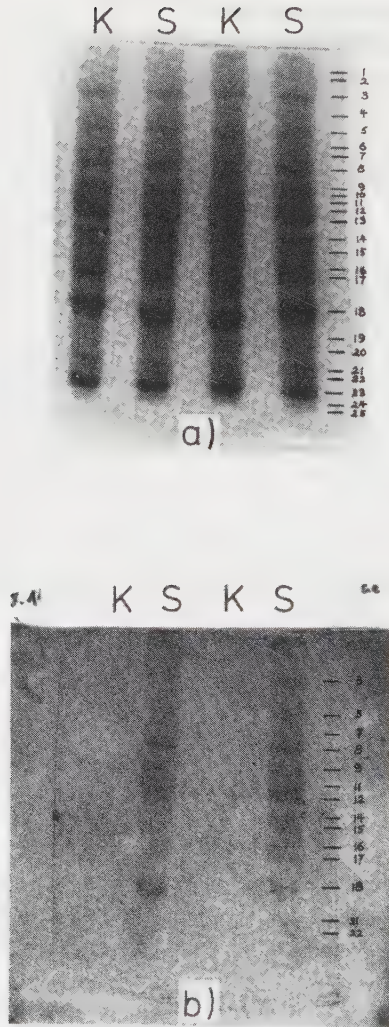


Abb. 39

Coomassiefärbung (a) und Fluorographie (b) der SDS-Gel-Elektrophorese von Lebergesamtproteinen aus unbehandelten (k) und mit Silybin behandelten Ratten (S) (150 µg Protein/Laufstrecke).

Nach Auftrennung auf dem SDS-Gel und Coomassiefärbung zeigten die Bahnen der Proteine aus silybinbehandelten und unbehandelten Ratten eine etwa gleichermaßen intensive Färbung (Abb. 39 a)). Die Schwärzung der Fluorographie war jedoch im Bereich der Bahn mit Proteinen aus silybinbehandelten Ratten deutlich stärker (Abb. 39b)).

Neben diesem visuellen Eindruck wurden die Proteinlaufstrecken des SDS-Gels densitometrisch ausgewertet. Die Coomassiefärbung und die Fluorographie der radioaktiv markierten Proteinbanden wurden in Form transparenter Positive fotografiert. Die Extinktionswerte der den Banden entsprechenden Schwärzungen wurden bestimmt (Hirschmann Densitometer) und grafisch gegen die Länge der Laufstrecke aufgetragen. Zunächst wurden die Densitogramme der mit Coomassie gefärbten Banden der Leberproteine aus silybinbehandelten und unbehandelten Ratten verglichen (Abb. 40).

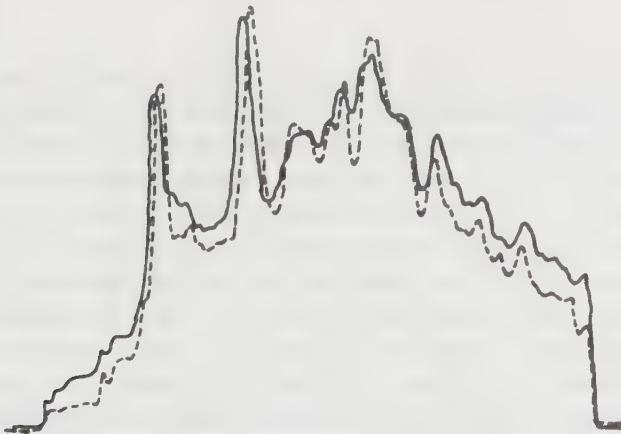


Abb. 40

Densitogramme der mit Coomassie-Brillantblau-G250 angefärbten Banden der Leberproteine von unbehandelten (-----) und mit Silybin behandelten (——) Ratten

Abb. 40 zeigt die weitgehend gleiche Anordnung und Intensität der Extinktionen der gesamten ohne und mit Silybineinfluß vorhandenen und neusynthetisierten Proteine der Zelle.

In gleicher Weise wurde auch die densitometrische Auswertung der Fluorographie vorgenommen (Abb. 41).



Abb. 41

Densitogramme der Laufstrecken der fluorographisch detektierten Proteine aus den Lebern unbehandelter (-----) und silybinbehandelter (———) Ratten

Abb. 41 zeigt nur die Extinktion der neusynthetisierten Proteine. Die Proteinbanden aus silybinbehandelten Ratten zeigen eine höhere Radioaktivität (vor allem im rechten Teil des Densitogramms, der die Banden der niedermolekularen Proteine darstellt), als die aus unbehandelten Tieren. Um festzustellen, welche der in Abb. 40 gezeigten Proteine bevorzugt synthetisiert werden, wurde das Densitogramm der mit Coomassie gefärbten Proteine aus unbehandelten Ratten mit dem Densitogramm der Fluorographie der Proteine aus den mit Silybin behandelten Tieren verglichen. Dabei war zu prüfen, in wie weit die Lage der Extinktionsmaxima der beiden Densitogramme übereinstimmt, d.h., inwieweit die gefärbten Proteinbanden auch Radioaktivität aufwiesen (Abb. 42).

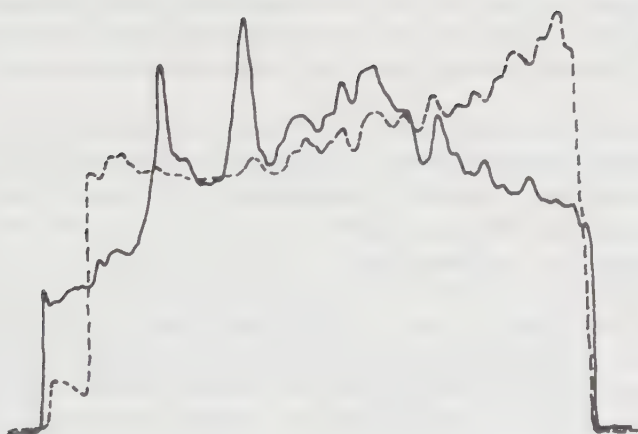


Abb. 42

Densitogramme der Coomassiefärbung der Leberproteine aus unbehandelten Ratten (—) und der Fluorographie der Proteine aus silybinbehandelten Ratten (-----)

Der qualitative Vergleich der nach Proteinfärbung gewonnenen und nach fluorographischer Detektion der Radioaktivität erhaltenen Densitogramme zeigt, daß im mittleren Bereich jeweils die Lage einer Anzahl von Extinktionsmaxima übereinstimmt. Im ersten und letzten Drittel der Kruven ist die Zahl der in Übereinstimmung zu bringenden Extinktionsmaxima jedoch gering.

Dies bedeutet, daß einerseits die unter Silybineinfluß vorhandenen und neu synthetisierten Zellproteine qualitativ gleich sind (vergl. Abb. 40 und 41), daß andererseits jedoch der vermehrte Einbau von ^{14}C -Leucinnur in eine geringere Anzahl von Zellproteinen erfolgt (Abb. 42).

Aus den Kurven der Abb. 40, 41, 42 kann daher geschlossen werden, daß die Biosynthese einer begrenzten Anzahl von Proteinen in den Lebern silybinbehandelter Ratten (wahrscheinlich im Bereich der Proteine mit mittlerem und niedrigem Molekulargewicht) besonders gesteigert ist.

Nachdem nach unserem heutigen Wissen eine Geninduktion durch das Flavonoid unwahrscheinlich ist, darf man annehmen, daß in der Folge eines "aktivierten Translationsapparates" (Vermehrung der Ribosomen) die Syntheserate besonders jener Proteine am meisten betroffen wird, die im Zellstoffwechsel einem schnellen turn-over unterliegen.

D I S K U S S I O N

Die lebertherapeutische Anwendung des Silybins, eines Flavonolignans aus der volkstümlichen Heilpflanze *Silybum marianum* (Mariendistel), gab Anlaß zu untersuchen, ob und wie das Silybin in die biochemischen Prozesse der Leberzelle eingreift.

Da die antihepatotoxische Wirkung des Silybins offenbar nicht durch Aktivierung des fremdstoffabbauenden Enzymsystems erfolgt (5,6), wurde die Schutzwirkung des Silybins gegen Schadstoffe den antioxidativen und Radikalfängereigenschaften zugeschrieben (78) oder auch auf einen membranstabilisierenden Einfluß des Silybins zurückgeführt (9,10,11,12). Zudem war eine fördernde Wirkung des Silybins auf die Regeneration von geschädigten Lebern (Teilhepatectomie) festgestellt worden (95,96).

SONNENBICHLER und Mitarb. (14,15) fanden, daß auf Grund der Aktivierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase-A durch Silybin die rRNA-Synthese in Leberzellkernen und Hepatocyten gesteigert war.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zeit- und Dosisabhängigkeit der RNA- und Proteinbiosynthese unter Silybineinfluß gemessen.

Voraussetzung für das Eintreten einer Wirkung des Silybins auf die RNA- und Proteinbiosynthese ist die Aufnahme von Silybin bzw. Vorläufermolekülen in die Zelle und damit die Permeation dieser Stoffe durch die Zellmembran. Bei Versuchen mit Ratten konnte nach einer raschen Resorption (1), eine Anreicherung des Silybins in der Leber, neben einer geringeren Verteilung in anderen Organen, festgestellt werden (13,14). Damit war eine wichtige Voraussetzung für die Silybinwirkung gegeben.

Eine Untersuchung der Beeinflussung von Membraneigenschaften durch Silybin bei Hepatocyten zeigte zunächst (Abschn. II.A. 2.1.1.), daß das Silybin nicht passiv durch die Membran dif-

fundierte, sondern daß Bindungsvorgänge beim Durchtritt des Silybins durch die Membran beteiligt sind. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (11,48) und legte die Möglichkeit nahe, daß das Silybin durch Permeabilitätsänderungen in der Membran (49) die Uridinaufnahme beeinflussen könnte.

Verschiedene Testreihen der vorliegenden Arbeit (Abschn. II.A. 1.1.) zeigten, daß bei Ratten eine Erhöhung der Aufnahmerate des radioaktiv markierten RNA-Bausteins Orotsäure in die Leber unter Silybineinfluß in gewissen Konzentrationsbereichen beobachtet werden kann, so daß vom Nukleosidangebot her, das einen limitierenden Faktor für die RNA-Synthese darstellt, kein Hindernis für eine erhöhte RNA-Synthese besteht. Die Uridinaufnahme war in Gegenwart kleiner Dosen Silybin erhöht, unter Verwendung großer Dosen hingegen zeigte sich eine deutlich geringere Uridinaufnahme als bei völlig unbehandelten Hepatocyten (Abschn. II.A.2.1.2.).

Die Hemmung durch hohe Silybindosen (300 µg/ml) könnte Ausdruck einer unspezifischen Wechselwirkung von phenolischen OH-Gruppen des Silybins mit Membranproteinen sein (6). Es ist anzunehmen, daß der unspezifische, die Permeabilität für Uridin verringern- de Einfluß des Silybins auf die Membran mit Abnahme der Silybinkonzentration verschwindet. Kleine Silybinkonzentrationen dürften die Membran nicht mehr beeinflussen. Die Erhöhung der Uridinaufnahme unter Einfluß kleiner Dosen (2 µg/ml) Silybin kann deshalb nicht mit einer "positiven" Silybinwirkung an der Membran erklärt werden. Es ist anzunehmen, daß sich im Bereich geringerer Silybindosen die Aufnahme von Uridin wahrscheinlich durch einen Rückkopplungseffekt infolge der - wie gezeigt - stimulierten RNA-Synthese erhöht.

Die schon in vivo gezeigte vermehrte Precursoraufnahme in die Leber silybinbehandelter Ratten (S. 7) konnte also bei Hepatocyten in vivo bestätigt und in Abhängigkeit zur Silybindosis gebracht werden.

Die bei Ratten von Silybin beeinflusste rRNA-Synthesestimulierung (13) wurde als Einbaurate von ^{14}C -Orotsäure in die rRNA der Ribosomen aus Lebern gemessen (Abschn. II.A.1.2.). Die Stimulierung hielt dabei in vivo bis zu 39 Stunden an. Diese Langzeitwirkung bei Ratten dürfte nicht nur durch den bei Hepatocyten (Abschn. II.A.2.1.1.) festgestellten, relativ langen Verbleib des Silybins in den Zellen erklärbar sein, sondern auch durch Silybindepots im Organismus. Neben einem Silybindepot durch Bindung an Serumproteine wird das durch die Galle abgeschiedene Flavonolignan in einem enterohepatischen Kreislauf (1,22,23) immer wieder in die Leber zurückgelangen, bevor es endgültig ausgeschieden wird (24,25).

Zur Vereinfachung des Systems wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Versuche mit isolierten Hepatocyten (31,36) durchgeführt, um Zeit- und Dosisabhängigkeit der Effekte besser studieren zu können.

Da die Uridinaufnahme der Hepatocyten durch den Einfluß kleiner Dosen Silybin ($2\text{ }\mu\text{g/ml}$) erhöht war, schien es sinnvoll, die silybinbeeinflussten RNA-Syntheseraten bei ähnlichen Flavonoidkonzentrationen zu messen (Abschn. II.A.2.3.2.). Wie auch auf Grund der RNA-Synthesesteigerung unter Silybineinfluß in vivo (Abschn. II.A.1.1.) erwartet werden konnte, trat bei Hepatocyten unter Anwendung kleiner Dosen ($2\text{ }\mu\text{g/ml}$) eine Steigerung, unter Anwendung großer Dosen ($> 10\text{ }\mu\text{g/ml}$) eine Hemmung der RNA-Synthese ein. Auf Grund der von der Silybindosis abhängigen Beeinträchtigung der Membranpermeabilität für Uridin, und des direkten Zusammenhangs von Uridinaufnahme und RNA-Synthese (51,50), ist die RNA-Synthesehemmung als Folge einer gehinderten Uridinaufnahme unter Einfluß des Silybins zu erklären. Die stimulierende Wirkung kleiner Dosen Silybin auf die RNA-Synthese war als kooperative Beeinflussung der Enzymaktivität der DNA-abhängigen RNA-Polymerase A nachgewiesen (15) worden.

Es kann somit festgehalten werden, daß die Beeinflussung der RNA-Synthese durch Silybin zwei Effekten unterliegt: Mit steigender Silybinkonzentration wird die anfängliche spezifische Aktivierung der Polymerase A von einer unspezifischen Permeabilitätsverminderung der Membran für Uridin überlagert, wobei sich dosisabhängig das Bild einer zunächst gesteigerten, dann aber gehemmten RNA-Synthese ergibt.

In einigen ergänzenden Versuchen wurde der Einfluß von Silybinderivaten auf die RNA-Synthese untersucht, da das schwer lösliche Silybin nur nach Derivatisierung mit Bernsteinsäure oder Glucamat in wasserlöslicher Form appliziert werden kann. Ein möglicher Wirkungsunterschied zum freien Molekül könnte dadurch bedingt sein: Ein Einfluß des hydrophilisierenden Bernsteinsäurerestes im SHS auf das System konnte für hohe Dosen wahrscheinlich gemacht werden. Der Bernsteinsäurerest zeigte dabei eine hemmende Wirkung auf die RNA-Synthese in Hepatocyten. Glucamat als Komplexbildner überlagerte die Silybinwirkung im positiven Sinn als erhöhte Stimulierung (Abschn. II.A.2.4.1.). Angeregt durch die Untersuchungen von VOGEL und ZOLTAN (67,68), die eine antitoxische Wirkung des Silybins in Nieren- und Hirngewebe festgestellt hatten, wurde untersucht, inwieweit Silybin leberspezifisch wirkt. Als Beispiel für eukaryontische Zellen anderer Herkunft dienten Raji-Zellen. Bei ihnen wurde die RNA-Synthese jedoch nicht beeinflusst (Abschn. 3.2.). Demnach scheint Silybin die RNA-Synthese nicht in allen eukaryontischen Zellen zu stimulieren.

Es interessierte ferner die Frage, welche Strukturmerkmale des Silybinmoleküls für die RNA-Synthesestimulierung verantwortlich sind (Abschn. 3.3.). Die Flavonoide Taxifolin und Hesperetin waren in der Lage, die RNA-Synthese in Hepatocyten ebenfalls, wenn auch nicht so hoch wie Silybin, zu stimulieren. Daraus wurde ein wirksames Strukturprinzip abgeleitet, nämlich eine bestimmte Anordnung von OH- und OR-Gruppen im teilaromatischen Molekül.

Als biochemische Reaktionsfolge schließt sich an die RNA-Synthese die Proteinsynthese in der Zelle an. Eine Voraussetzung dafür ist die Aminosäureaufnahme, die für das Ausmaß der Proteinbiosynthese einen regulativen Faktor darstellt (86). Im Hepatocytensystem war die Aufnahme von Leucin in die Zelle unter Einfluß kleiner Dosen Silybin gesteigert, blieb bei großen Silybindosen jedoch unbeeinflußt. Obwohl eine größere Dosis Silybin eine Nucleosidaufnahme hemmen würde, schien die Aminosäureaufnahme dadurch nicht beeinträchtigt zu werden (Abschn. II.B.1.1.). Das bedeutet, daß das Silybin in hohen Dosen die Permeabilität der Zellmembran nicht für alle Stoffe in gleicher Weise beeinflußt. Die Einbaurate von radioaktiv markiertem ^{14}C -Leucin in neusynthetisiertes Protein war unter Einfluß kleiner Dosen Silybin bei Hepatocyten leicht gesteigert, durch große Dosen aber nicht gehemmt. Dies deutet darauf hin, daß das Silybin offenbar keinen direkten Einfluß auf die Translation nimmt. Es ist wohl eher eine indirekte Beeinflussung der Proteinbiosynthese als Folge einer durch Silybin aktivierten Transkription zu diskutieren.

Einen weiteren Anhaltspunkt zum Verständnis der Silybinwirkung ergab eine elektrophoretische Analyse der neusynthetisierten Proteine. Es konnte zum einen ein allgemein wirkender indirekt aktivierenden Einfluß des Silybins auf die Translation angenommen werden, und damit eine allgemeine Steigerung der Proteinproduktion. Alternativ hierzu wäre denkbar, daß es unter der Wirkung von Silybin zur bevorzugten Transkription von Genen kommt, und die Produktion bestimmter Gruppen von Proteinen gesteigert wird. Diese zweite Möglichkeit konnte elektrophoretisch unwahrscheinlich gemacht werden. Aus den experimentellen Daten der Proteinanalyse ist eher anzunehmen, daß das Silybin eine generelle Anhebung der RNA- und Proteinsyntheseraten bewirkt.

Die Proteinbiosynthese unter Silybineinfluß wurde in vivo auch deswegen untersucht, um auf den therapeutischen Aspekt der Silybinwirkung näher einzugehen. In statistisch ausgewerteten Versuchen mit Kollektiven verschieden behandelte Ratten zeigte sich bei silybinbehandelten Ratten eine gegenüber unbehandelten Tieren signifikant gesteigerte Proteinbiosynthese (II.B.2.2.), wodurch die Ergebnisse der Untersuchung der Proteinbiosynthese bei Hepatocyten bestätigt werden konnten. Bei Tieren, die durch Vorbehandlung mit subletalen Dosen von D-Galaktosamin eine künstlich erzeugte Hepatitis aufwiesen, normalisierten sich durch gleichzeitig und nachträglich verabreichte Silybingaben die durch D-Galaktosamin gehemmte Proteinbiosynthese (II.B.2.3.). Die Erhöhung der Proteinsyntheserate unter Silybineinfluß war auch von anderen Autoren bei hepatektomierten Ratten gefunden worden (98,99), ebenso die Aufhebung des D-Galaktosaminschadens (8). Die gesteigerte Proteinbiosynthese in den Hepatocyten ist eine Voraussetzung für den Ersatz zerstörter Zellproteine. Es ist also vorstellbar, daß durch erhöhte Proteinbiosynthese in der Leber Regenerierungsvorgänge beschleunigt und Leberschäden wirksamer aufgehoben werden. Da der Einfluß des Silybins zu einer erhöhten Proteinbiosynthese in den Leberzellen führt, kann der therapeutische Einsatz des Pharmakons als sinnvoll angesehen werden.

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

Markierung und Reinigung von ^3H -Silybin

Silybin (Fa.Madaus, Köln) wurde mittels der Wilzbachmethode (44) tritiiert. 950 mg Silybin wurde 2 Wochen lang mit 6 Ci Tritiumgas bei einer Temperatur von 26°C behandelt. Nach Entfernung der labilen Anteile betrug die spezifische Aktivität 0.668 mCi/mg/Silybin. Die Substanz wurde durch Chromatographie an Kieselgelsäulen gereinigt (Kieselsäure, Mallinckrodt, Fa.Roth, Karlsruhe): Etwa 100 mg ^3H -Silybin wurden in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst, 5 g trockenes Kieselgel zugemischt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das trockene Kieselgel mit dem gebundenen ^3H -Silybin wurde in Chloroform aufgeschwemmt und auf eine vorpräparierte Kieselgelsäule geschichtet. Das Material wurde dann mit einem Gemisch aus Chloroform/Aceton 9:1 eluiert, in 10 ml Fraktionen gesammelt und die Extinktion bei 280 nm gemessen ($\epsilon_{280} = 19580$). Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde auf Kieselgelplatten (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator, 0.25 mm Schichtdicke, Fa.Merck, Darmstadt) getestet. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus Chloroform/Aceton/Ameisensäure 9:1:2 oder Äthylacetat verwendet. Die Identität der Substanz wurde durch den Vergleich der R_f -Werte von ^3H markiertem und unmarkiertem Silybin bestätigt. Weiterhin wurden die Platten mittels eines Dünnschicht-Scrapers (Fa.Desaga, Heidelberg) in 0.5 cm breiten Streifen ausgekratzt, das Kieselgel in Szintillationsröhrchen gefüllt, mit 5 ml Äthoxyäthanol und 10 ml Toluolszintillator versetzt und die Radioaktivität gemessen.

Nicht radioaktive Silybinderivate

a) Silybin-Na

Das Silybin wurde durch Auftropfen von 0.1 n NaOH oder 1 M Na_2CO_3 in Lösung gebracht. Ein verbleibender kleiner Überschuß an Natriumcarbonat wurde bei der pH-Einstellung vor der Verwendung neutralisiert. Löslichkeit: ca. 6 mg Silybin in 0.5 ml 1 M Na_2CO_3 (0.1 n NaOH).

Die Lösung konnte mit Wasser und Medium ohne Veränderung verdünnt werden. Erst bei Säurezugabe fiel das Silybin ab pH 6 durch Protonierung wieder aus.

b) Silybin-Glucamat

Silybin bildet mit Glucamat einen äquimolaren 1:1-Komplex, der in Wasser löslich ist. 1 mg Silybin und 1/2 mg N-Methyl-glucosamin gehen in Hank's-Lösung langsam in Lösung. Ca^{++} und NaHCO_3 führten zu Ausfällungen, deshalb wurde bei der Verwendung von Medium 199 auf die Zugabe dieser Ionen verzichtet. Trotzdem wurde die Lösung nach einiger Zeit trüb und war dann für den Test ungeeignet.

c) Silybin-hemisuccinat

Das in dieser Form erworbene Silybinhemisuccinat-Na (Fa. Madaus, Köln) wurde je nach Versuchsbedingungen in Wasser, Medium 199, Hank's-Lösung oder 0.9% NaCl-Lösung gelöst (104).

d) Silybin

Das freie Silybin konnte durch Auflösen in DMSO/Wasser (1:1) in wässrige Lösung gebracht werden.

Verwendete Tiere

Zu allen Versuchen wurden steril gezüchtete 150 - 180 g schwere Wistarratten beiderlei Geschlechts verwendet. Sie wurden, wenn nicht anders vermerkt, ad libitum gefüttert und getränkt. Die Injektionen erfolgten intraperitoneal in die durch Äthernarkose ruhiggestellten Tiere. Die applizierten Stoffe wurden einzeln gelöst und an getrennten Stellen der Bauchdecke injiziert: Silybin in 0.5 ml DMSO/H₂O (1:1). Silybinhemisuccinat, Silybin-Na, Orotsäure, Uridin, Leucin in 200 µl 0.9%iger NaCl-Lösung.

Die Kontrolltiere erhielten nur das jeweilige Lösungsmittel.

Erzeugung einer künstlichen Hepatitis mit D-Galaktosamin

Bei ausgewachsenen Ratten (ca. 180 g) kann in vivo mit 200 mg D-Gal-N/kg Kgw. in 24 Stdn. eine reversible Hepatitis ohne Necrosen erzeugt werden. 400 mg/kg Kgw. führen zu extensiven Necrosen mit Todesfolge (82). Für die Versuche mit DGalN wurde eine zwischen diesen beiden Dosen liegende Arbeitsdosis von 35 mg/100 g Körpergewicht gewählt. Die erfolgte Leberschädigung zeigte sich bereits in makroskopischen Veränderungen. Einzelne kleine Necroseherde gaben der durch entzündliche Infiltrate gequollenen Leber ein fleckiges, schwammiges Aussehen.

Auflösung von Blut- und Lebergewebsproben

Von dem aus der angeschnittenen Vena superior in den Bauchraum ausgetretenen Blut wurden 100 µl in ein Glasszintillatorfläschchen gegeben. Zusätzlich entnahm man ca. 100 mg von der herauspräparierten Leber und löste die Probe ungetrocknet in einem anderen Szintillationsgefäß (Glas) (105). 0.2 ml 70% HClO_4 und 0.4 ml 30% H_2O_2 wurden auf die Blut- oder Gewebprobe pipettiert und das Glas gut verschlossen 1 Stde. bei 95°C im Trockenschrank stehengelassen, bis der Inhalt klar und farblos war. Nach dem Abkühlen füllte man mit 2 - 3 ml Äthylenglycolmonoäthyläther und 8 ml Toluolszintillator auf. Die Lösung mußte umgehend gemessen werden, da sie mit der Zeit gelb wurde.

Messungen zur Orotsäure-Silybin-Präzipitation

Ein gemeinsamer Ansatz für Kontrolle und Test enthielt: 2 ml 0.1 n NaCl, 0.1 µCi ^{14}C -Orotsäure (23.3 Ci/mM) und gemäß Tab. 3 zugesetzte kalte Orotsäure. Er wurde zu gleichen Teilen auf zwei Zentrifugengläschen aufgeteilt. Zum Test, zur Kontrolle, setzte man 100 µl Wasser als Lösungsmittelvolumen und gemäß Tab. 3 verschiedene Mengen in 100 µl Wasser gelöstes Silybinhemisuccinat-Na. Beide Gläser wurden bei Zimmertemperatur 15 min lang geschüttelt. Dann zentrifugierte

man bei 3000 Upm (Christ Minifuge) 5 min ab. Aus dem Überstand wurden drei Aliquots von 0.5 ml für die Szintillationsmessung in je 6 ml Dioxanszintillator entnommen.

Bestimmung der Silybinkonzentration in der Zelle

32 ml einer Hepatocytenkultur mit 5×10^5 Zellen/ml in Medium 199 wurden bei 37°C in einem Sammelgefäß mit $1.56 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Silybinglucamat (238.27 mCi/mM) inkubiert. Nach 30 min entfernte man die Radioaktivität des Mediums durch Abzentrifugieren (1 min, 1000 Upm, Christ Minifuge) und kurzzeitiges Waschen (ca. 2 min) der Zellen mit 32 ml Hank's-Lösung. Nach Aufnahme der Zellen in 32 ml frischem Medium 199 wurde die Kultur auf 16 Zentrifugengläschen (= 8 Doppelwerte) verteilt und erneut im Wasserbad auf 37°C gebracht. Der Nullwert wurde vorher abgenommen. Nach den gewählten Zeiten wurden die Gläschen ins Eisbad gebracht und schnell auf Cellulosenitratfilter (Sartorius Membranfilter, Durchmesser 25 mm, Porengröße $0.6 \mu\text{m}$) abfiltriert. Diese wurden in Glasszintillatorfläschchen zur Gewebsauflösung mit $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HClO}_4$ (siehe Seite 85) gegeben. Nach Zugabe von 6 ml Toluolszintillator wurde die Radioaktivität gemessen.

Präparation der Leberzellkerne

Alle Arbeiten wurden bei $0 - 4^\circ\text{C}$ durchgeführt. Lebern von Wistarratten wurden im 10fachen Volumen 0.32 M Succrose + 2 mM MgCl_2 + 10 mM Tris/HCl, pH 7.0 homogenisiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei $1200 \times g$ wurden die Kerne in 2.2 M Succrose + 1 mM MgCl_2 + 10 mM Tris/HCl, pH 7.0 resuspendiert und über $\frac{1}{6}$ Volumen 2.2 M Succrose + 1 mM MgCl_2 + 10 mM Tris/HCl, pH 7.0 überschichtet. Nach 90 min langem Zentrifugieren bei $50\,000 \times g$ in einem SW 30 Rotor wurde das Kernpellet abgetrennt, mit 0.32 M Succrose gewaschen und in 100% Glycerol bei -30°C aufbewahrt.

Ribosomengewinnung und -reinigung

Die in den Homogenisator geschnittene Leber wurde mit folgender Lösung auf 23 ml aufgefüllt und homogenisiert (21):

gleiche Teile 1.4 M Succrose, 0.1 M KCl, 0.12 M KHCO_3 , 0.08 M K_2HPO_4 ; dazu 0.01% Baykovin, mit 0.1 n HCl auf pH 7.4 gebracht.

Durch anschließendes Zentrifugieren 30 min bei 27 000 x g (MSE-Zentrifuge, 15 000 Upm) konnten die Zellkerne und Mitochondrien abgetrennt werden. Den Überstand zentrifugierte man 70 min bei 105 000 x g (Christ UZ, 40 000 Upm). Die sedimentierten Mikrosomen wurden in 45 ml wie folgt suspendiert: zu gleichen Teilen 1.4 M Succrose, 0.1 M KCl, 0.036 M MgCl_2 , 0.004 M Dithiotreitol, dazu 0.01% Baykovin.

Nach Zugabe von 4.5 ml 10% Triton wurde nochmals 15 min langsam gerührt und anschließend nochmals mit 105 000 x g zentrifugiert, 70 min (UZ, 40 000 Upm). Das Sediment resuspendierte man schonend in 45 ml 0.001 M MgCl_2 , 0.01% Baykovin und fügte festes MgCl_2 bis zur Endkonzentration von 0.05 M hinzu. Anschließend wurde nochmals 15 min gerührt. Nach weiterem Zentrifugieren bei 27 000 x g (MSW, 15 000 Upm, 30 min) erhielt man ein Ribosomenpellet, das 4mal mit je 18 ml 0.01 M MgCl_2 , 0.01% Baykovin, gewaschen wurde. Zur Untersuchung löste man das Pellet in 5 ml 0.01 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.001 M MgCl_2 , 2% SDS.

Markierung der RNA

Zur Markierung der RNA in vivo wurde meist 25 μCi ^3H -Orotsäure (NEN, spezifische Aktivität 16.9 Ci/mM) verwendet. Bei Wistar-ratten wurde die Orotsäure in 0.5 ml physiologischer NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert. Die Kontrollratte erhielt nur Orot-säure injiziert. Nach variablen Zeiten wurden die Tiere mit Äther getötet, die Leber entnommen und zum Beispiel die Ribosomen isoliert. In Hepatocyten wurde die RNA mit ^3H -Uridin (NEN, spezifische Aktivität 26.3 Ci/mM) markiert.

Reinigung der DNase

Etwa 10 mg DNase I (Fa. Merck, Darmstadt oder Serva, Heidelberg) wurden in 2 ml 0.0025 M HCl gelöst und 2.5 Tage gegen dieselbe HCl-Lösung dialysiert. Dann wurden 2.5 ml einer 0.2 M Natrium-acetat-Lösung, pH 5.3, und 0.75 ml einer 1 M Jodacetat-Lösung

zugegeben und eine Stunde auf 55°C erhitzt. Nach einer kurzen Dialyse gegen 0.0025 M HCl und anschließender Zentrifugation bei 10 000 x g und 4°C erhielt man im Überstand 2 µg/ml gereinigte DNase I.

RNA-Synthese in isolierten Kernen

Etwa 1×10^6 Kerne wurden in 100 µl Synthesepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.9 + 3 mM MgCl₂ + 2 mM MnCl₂ + 3 mM Dithioerythritol + 125 mM NaCl + 0.6 mM ATP, 0.6 mM CTP, 0.6 mM GTP, 0.03 mM UTP und 0.5 µCi ³H-UTP, (spez. Akt. 20 Ci/mM) suspendiert. In einem abgeteilten Ansatz wurde 20 µg α-Amanitin/ml hinzugefügt. Die Flavonolignane wurden den betreffenden Ansätzen in Konzentrationen von 50 - 100 µg/ml zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurden die Ansätze mit 10% TCA gefällt und die Niederschläge auf Millipore-Filter (HAPW-Nitro-Cellulose, Durchmesser 24 mm, Porenweite 0.45 µm) gesammelt, 6 x mit 3 ml 5% TCA gewaschen und 10 min bei 80°C getrocknet. Anschließend wurde die Radioaktivität der in Toluol-Szintillator aufgelösten Filter in einem Packard-Tri-Carb-Szintillations-Zähler gemessen.

Silikonisierung von Glasgefäßen

Nach einer modifizierten Methode von BRYANT (106) wurde die Innenwand der Glasgefäße mit einer Silikonschicht überzogen und 15 min lang mit einer 5 - 10%igen Polydimethyl-siloxan (Silikonöl, Roth, Karlsruhe)-Lösung in Chloroform benetzt. Dann wurde 30 min bei 85°C getrocknet. Nach 3stündigem Einbrennen bei 250°C wurden die Gefäße 2 Stdn. mit warmen bidestilliertem Wasser gefüllt stehen gelassen. Es wurde zweimal mit Aqua bidest. nachgespült, bei 100°C getrocknet und im Autoklaven sterilisiert.

Kultur- und Waschflüssigkeiten

Für die Perfusion der Leber sowie zum Waschen von Zellen wurde Hank's-Lösung verwendet:

NaCl	8.00 g/l
KCl	0.40
(CaCl	0.14)
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.10
MgCl ₂	0.10
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0.06
KH ₂ PO ₄	0.06
Glucose	1.0
NaH ₂ CO ₃	0.35

Gasphase: Luft (107)

Die Salze wurden in Aqua bidest. unter Zugabe von Streptomycin und Penicillin G gelöst. Die Lösung wurde durch Milliporefilter (Porenweite 20 µm/Durchmesser 25 mm) sterifiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Isolierung und Inkubation der Hepatocyten

Die Leberzellen wurden nach einer modifizierten Methode von SEGLEN (33) präpariert: Der Ratte, die durch Äthervornarkose ruhiggestellt war, wurde i.p. Nembutal (Boehringer, Ingelheim) 0.1 ml/100 g Körpergewicht und zugleich Heparin (Novo-Industrie, Mainz) derselben Menge gespritzt. Für die chirurgischen Operationen ist Sterilität aller Gefäße, Pipetten, Bestecke und sonstiger Hilfsmittel Voraussetzung (108). Die Glasgefäße, mit denen die Hepatocyten in Berührung kommen, wurden silikonisiert. Als Arbeitsplatz diente eine sterile Werkbank. Nach Öffnung des Bauchraumes wurde die Vena cava inferior abgeklemmt, in die Vena portae eine Kanüle eingeführt und die Aorta dorsalis durchtrennt (41). Über die Vena portae wurde dann Ca²⁺-freie Hank's-Lösung (109) (etwa 5 ml/min) in die Leber gepumpt. Die Hank's-Lösung war auf 37°C erwärmt, O₂-gesättigt und enthielt 100 µg/ml Streptomycin und 100 Einheiten/ml Penicillin G. Die Lösung wurde solange (ca. 2 min) in die

Leber gepumpt, bis eine Schwellung sichtbar wurde. Über die linke Herzvorkammer wurde dann eine weitere Kanüle in die Vena cava inferior eingeführt und die Perfusion bis zur vollständigen Blutleere der Leber weitergeführt. Während der Perfusion wurde die Leber vom umgebenden Bindegewebe befreit und auf ein, mit einem Gitter abgedecktes, Becherglas transferiert. In dem Becherglas befand sich die "Enzymperfusionslösung" bestehend aus 30 mg Kollagenase II (IUB Nr. 3.4.4.19) (Boehringer, Mannheim) in 45 ml Ca^{2+} -freier Hank's-Lösung (36). Die Lösung war wie oben mit O_2 gesättigt, auf 37°C erwärmt und enthielt die erwähnten Antibiotica. Diese Lösung wurde dann 20 min lang (10 ml/min) durch die Vena portae in die Leber gepumpt. Anschließend wurde das Lebergewebe durch Einstechen der Kanüle an verschiedenen Stellen bei laufender Pumpe aufgelockert. Die intrazelluläre Matrix war nun soweit aufgelöst, daß die Leber durch Schwenken in der Kollagenaselösung zu einer gleichmäßigen Zellsuspension zerfiel. Diese wurde durch vier Lagen Gaze gefiltert und 1mal abzentrifugiert (Christ Tischzentrifuge) 500 Upm, = 80 x g, Stufe 35, 2 min. Man wusch noch 1mal mit eiskalter Ca^{++} -haltiger (normaler) Hank's-Lösung (37). Im Zellpellet befanden sich etwa 5×10^7 parenchymatische Leberzellen pro g. 10 μl Pellet, 1:100 mit Medium oder physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, wurden mittels einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Auch ungefärbt konnte schon zwischen intakten Zellen, die eine gelbliche Farbe und wohldefinierten Umriß besitzen und beschädigten Zellen, die flach, milchig und erdfarben sind und faserige Ränder aufweisen, unterschieden werden.

Die Anzahl intakter Zellen wurde durch Trypan-Blaufärbung gemessen (36). Dafür wurden 100 μl Zellsuspension mit 300 μl isotonischer, 0.6% Trypan-Blaulösung (150 mg Trypan-Blau und 120 mg NaCl in 25 ml H_2O bidest.) angefärbt (Färbekonzentration 0.45%). Die so behandelte Suspension ließ man in eine Neubauerzählkammer einlaufen (33). Im Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung konnten die blau angefärbten beschädigten Zellen gut von den farblosen intakten, unterschieden und ausgezählt werden.

Die oben angeführte Methode ergab Ausbeuten vitaler Hepatocyten von 90 - 95%. Anschließend wurden die Zellen in Medium 199 (Fa. LS-Laborservice, München) in einer Konzentration von ca. 5×10^5 Zellen/ml in Falcon-Plasticculture-flasks (Fa. LS-Laborservice, München) in feuchter Atmosphäre bei 37°C kultiviert (110, 33). Auf die Zugabe von fötalem Kälberserum wurde verzichtet, dafür aber 2 mM Glutamin und 0.35 g NaHCO_3 /l zugesetzt (39). Die Sammelgefäße enthielten ein die Summe der einzelnen später abzunehmenden Probenvolumina um ca. 20% übersteigendes Suspensionsvolumen. Die Zellen wurden aus dem Pellet in das auf 37°C erwärmte Medium, in dem das Silybin bereits gelöst war, pipettiert und 5 min lang vorinkubiert. Dann wurde der Versuch durch Zugabe des radioaktiven Precursors gestartet (111).

Gewinnung und Inkubation von Raji-Zellen

Raji-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 1% Glutamin, 100 IE Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum (Fa. Seromed, München) bei 37°C kultiviert. Die Kulturflaschen (Erlenmeyerkolben oder Falcon-Plastik-Flaschen) waren luftdicht verschlossen. Das Verhältnis Suspension-Gasphase (Luft) betrug 1:5. Die Zellsuspension wurde wiederholt nach 2 - 3 Tagen aufgeteilt und mit frischem Medium (1:1, 1:2 oder 1:3) aufgefüllt. Die Zellen durchlaufen in ca. 4 Tagen eine exponentielle Wachstumsphase, wobei die Zellzahl im Medium von ca. 0.2×10^6 auf 1.5×10^6 Zellen/ml ansteigt. Die Vitalität der Raji-Zellen wurde durch Trypan-Blaufärbung geprüft (100 μl Zellsuspension + 300 μl 0.6% Trypan-Blau in 0.9% NaCl-Lösung). Die mit Raji-Zellen in Berührung gekommenen Gegenstände müssen mit 70% Äthanol desinfiziert werden.

Die Raji-Zellen wurden in einer Anzahl von 5×10^5 Zellen/ml für die Versuche inkubiert. Sie wurden mit 1 000 x g (= 2 500 Upm, Christ Minifuge) aus der gekühlten Kultursuspension abzentrifugiert und durch Verdünnen mit RPMI-Medium auf die genannte Zellzahl eingestellt.

Der Versuch konnte durch Erwärmen der Zellsuspension auf 37°C gestartet werden. Die Einzelproben wurden vor der TCA-Fällung im CO₂-Äthanolbad abgekühlt.

Bestimmung der TCA-unlöslichen Radioaktivität in Leberorgan, Hepatocyten und Raji-Zellen

Nach erfolgter Inkubation mit radioaktiver Orotsäure, Uridin oder Leucin etc. wurden die Zellen aus 1 ml Suspension oder Homogenat zentrifugiert und mit 1 ml eiskalter Hank's-Lösung kurzzeitig (ca. 2min) gewaschen (180 x g $\hat{=}$ 1 000 Upm, 45 sec, Christ Minifuge). In 1 ml Hank's-Lösung resuspendiert wurde das hochmolekulare Material der Zellen bzw. des Leberhomogenats mit 2 ml 10% TCA (250 g Trichloressigsäure, 55.75 g Na₄P₂O₇, 27.1 g NaH₂PO₄, H₂O ad 2000 ml) gefällt (112, 113). Die Fällung wurde mit 2 ml Aceton gewaschen (1000 x g = 3 000 Upm, 30 sec, Christ Minifuge). Die in 2 ml 10% TCA resuspendierte Fällung wurde auf Whatmann GF/C 25 Glasfaserfilter abgefiltert. Zur Bestimmung von Protein mußte die Fällung vorher durch Hydrolyse (15 min, 95°C und Waschen von markierter Aminoacyl-t-RNA befreit werden.

Bestimmung der TCA-löslichen Radioaktivität in Hepatocyten

Die Zellen wurden wie oben kurzzeitig gewaschen und mit 10%iger TCA gefällt. Aus dem Überstand wurden bis zu 4 Aliquots von je 100 µl abpipettiert und in Dioxanszintillator aufgenommen (43).

Elektrophoretische Analyse der Leberproteine

1 g Leber wurde in der Kälte mit 5 ml 0.32 M Succrose, 30 mM Tris, pH 6, homogenisiert und 30 min bei 3 000 Upm (Christ Minifuge) zentrifugiert. Im Überstand wurde die DNA mit DNase und die RNA mit RNase (5 µg/ml, 15 min, 35°C) verdaut. Mit 6-fachem Volumen Aceton wurden die Proteine gefällt. Nach 30-minütigem Rühren zentrifugierte man 1 min lang bei 3 000 Upm ab und wusch 2mal mit destilliertem Aceton. Die Fällung wurde im Exsiccator getrocknet. Die Proteine konnten pulverisiert

bei 0°C gelagert werden. Zur Elektrophorese der Proteine wurde ein SDS-Gradientengel mit Spacer-Gel verwendet (101). Pro Bahn wurden 150 µg Protein in 50 µl Probenpuffer aufgetragen. Die radioaktive Markierung der Proteine aus silybin-behandelten Ratten betrug ca. 3000 cpm/mg, aus unbehandelten ca. 800 cpm/mg. Nach dreistündiger Elektrophorese bei 20 mA wurden die Proteinbahnen des Gels gefärbt (0.25% Coomassie in Entfärber: 10% Essigsäure, 45% Methanol, 45% H₂O, 20 min, 60°C) und entfärbt (114).

Die Radioaktivität der Proteinbanden wurde außerdem fluorographisch nach folgender Methode detektiert:

Direkt nach der Elektrophorese oder nach dem Färben wurde das Gel in ein 20-faches Volumen Dimethylsulfoxid (DMSO) 30 min lang eingelegt und noch einmal 30 min in frischem DMSO belassen. Dann wurde das Gel im 4-fachen seines Volumens DMSO mit 20% PPO 3 Std. lang gesättigt und anschließend für 1 Stde. im 20-fachen Volumen gewässert. Das unter Vakuum getrocknete Gel wurde mit einem medizinischen Röntgenfilm in Kontakt gebracht, der vorher durch einen kurzen Lichtblitz sensitiviert worden war und bei -70°C exponiert (102, 103).

Von Coomassiefärbung und Fluorographie des Gels wurden transparente photographische Positive angefertigt, auf denen die Proteinbanden densitometrisch (Elscript 1, Hirschmann, München) gemessen werden konnten.

Analysenmethoden

Radioaktivitätsmessungen

Alle Proben, wässrige und nichtwässrige, wurden in 5 ml Dioxan-Szintillator nach BRAY und KOBAYASHI (105, 115) aufgelöst (15.6 g PPO, 0.4 g Bis-(o-methyl-styryl-)-benzol, 120 g Naphthalin, 200.0 ml Methanol, 40.0 ml Äthylenglycol ad 2000.0 ml Dioxan, das vorher mit Aluminiumoxid ausgeschüttelt worden war) und in einem Packard Tricarb, Modell 3390, szintillometrisch gemessen. Einige nichtwässrige Proben wurden mit 10 ml eines Toluolszintillators (1000 ml Toluol, 500 ml Äthylenglycolmonoäthyläther, 6 g PPO) gemessen.

Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA Konzentrationen wurde entweder durch die Extinktion bei 260 nm bestimmt, wobei 24 O.D. = 1 mg RNA entsprechen oder nach der Methode mit Orcin (116) gemessen und die Konzentration aus einer entsprechenden Eichkurve entnommen.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Auch die Konzentration der DNA wurde durch die Extinktion bei 260 nm gemessen, wobei 20 O.D. = 1 mg DNA entsprechen. Außerdem wurde sie nach der Methode von DISCHE (117) bestimmt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde entweder nach LOWRY (118) oder nach einer Tüpfelmethode bestimmt (119). Zu diesem Zwecke wurden mehrere Aliquots der zu messenden Lösung auf Celluloseacetat-Streifen (Cellologel, Fa. Chemetron, Mailand) getüpfelt, und nach dem Trocknen die Streifen 10 min mit einer Lösung von 0.5% Amidoschwarz in 7% Essigsäure gefärbt. Dann wurden die Streifen mit einem Gemisch aus 45% H₂O, 45% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt, die nun blau angefärbten Flecke ausgestanzt und in einem Gemisch aus 80% Essigsäure, 10% Ameisensäure, 10% TCA unter Erwärmen aufgelöst. Durch Extinktionsmessung bei 630 nm im Photometer (PMQ II, Fa. Zeiss, Wetzlar) erhielt man mittels entsprechender Referenzen und Eichkurven die Proteinkonzentration.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Mariendistel (*Silybum marianum*) mit ihrem Hauptinhaltsstoff Silybin, ist seit dem Altertum in der Volksmedizin als Heilpflanze gegen Leberleiden bekannt.

In Ergänzung bereits vorliegender experimenteller Daten sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit Silybin die RNA- und Proteinsynthese in der Leber und in Hepatocyten stimuliert.

Zur Markierung der neusynthetisierten RNA wurde an Ratten ^{14}C -Orotsäure injiziert. Die Synthese der Ribosomen, sichtbar an der Zunahme der radioaktiven Markierung der r-RNA war in silybinbehandelten Ratten beschleunigt. Es zeichnete sich bereits in diesen Versuchen eine Dosisabhängigkeit der Stimulierung ab.

Um die Zeit- und Dosis-Abhängigkeit der RNA-Synthese genauer untersuchen zu können, wurden isolierte Hepatocyten verwendet. In die Zelle aufgenommenes Silybin blieb zum größten Teil über einen längeren Zeitraum an innere Zellstrukturen gebunden.

Durch hohe Silybindosen ($> 10 \mu\text{g/ml}$) war die Aufnahme des, für die RNA-Synthese notwendigen Vorläufers Uridin, gehemmt, vermutlich auf Grund einer unspezifischen Hinderung des Nucleosidvorstufentransportes in die Zellen.

Unter Einfluß geringer Dosen ($< 10 \mu\text{g/ml}$) war die RNA-Synthese in Hepatocyten deutlich stimuliert. Dabei konnte eine erhöhte Uridinaufnahme beobachtet werden, die mit einem Rückkopplungseffekt infolge des erhöhten Uridinbedarfs der gesteigerten RNA-Synthese erklärt wird.

Beim Vergleich mehrerer Derivate konnte die RNA-Synthese stimulierende Wirkung auf das freie Silybin zurückgeführt werden.

Silybin steigert die RNA-Synthese wie negativ verlaufende Versuche mit Raji-Zellen gezeigt haben, nicht in allen eukaryontischen Zellen.

Um Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erkennen, wurden 27 Flavonoide auf ihre synthesesstimulierende Wirkung in einem in-vitro-System mit isolierten Zellkernen und teilweise auch in Hepatocyten getestet. Neben Silybin zeigten sich Taxifolin und Hesperitin in der Lage, die RNA-Synthese in geringerem Maße zu stimulieren.

Zur Untersuchung des Einflusses auf die Proteinbiosynthese wurde erneut auf das in vivo-System zurückgegriffen. Die für die Proteinsynthese notwendige Aminosäureaufnahme in die Leberzellen wurde durch Silybin in keiner Dosierung beeinflusst. Die Proteinsynthese war durch hohe Silybindosen, die eine RNA-Synthese in jedem Falle hemmen würden, nicht inhibiert, jedoch durch geringe Dosen gesteigert. Dies legt den indirekten Einfluß des Silybins auf die Proteinsynthese als Folge der stimulierten RNA-Synthese, nahe.

Eine elektrophoretische Analyse der unter Silybineinfluß gebildeten Proteine macht es wahrscheinlich, daß Silybin nicht die Synthese spezifischer Proteine bewirkt, sondern zu einer generellen Anhebung der Syntheserate Anlaß gibt, die allerdings Proteine mit schnellem turn-over betrifft.

In vivo konnte gezeigt werden, daß Silybin die, nach Leberschädigung durch DGalN gehemmte Proteinsynthese wieder normalisiert, so daß die klinische Anwendung von Silybin als Lebertherapeutikum auch biochemisch verständlich ist.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) WAGNER, H., DIESEL, P., SEITZ, M., *Arzneim.Forsch.* 24, 466-471 (1974)
- 2) WAGNER, H., HÖRHAMMER, L., MÜNSTER, R., *Arzneim.Forsch.* 18, 688-696 (1968)
- 3) HÄNSEL, R., SCHULZ, I., PELTER, A., *JCS Chem.Comm.* 2013, 195-196 (1972)
- 4) *Chemical Abstracts* 81, 764 CS, 2494 CS (1974)
- 5) RAMELLI, G., MELDOLESI, J., *Arzneim.Forsch.* 26, 69-73 (1976)
- 6) SCHRIEWER, H., RUTKOWSKI, G., *Bericht* (1979)
- 7) HÖLZL, J., JURCIC, K., WAGNER, H., *Bericht* (1973)
- 8) BINDOLI, A., CAVALLI, L., SILIPRANDI, N., *Epatologie a* 23, 219-224 (1977)
- 9) VOGEL, G., TROST, W., BRAATZ, R. et al. *Arzneim.Forschung.* 25, 85-89 und 179-88 (1975)
- 10) SEEGER, R., BLECH, G., GRETZER, K., HEIM, A., *Arzneim.Forsch.* 24, 868-873 (1974)
- 11) FRIMMER, M., KROKER, R., *Arzneim.Forsch.* 25, 3, 394-396 (1975)
- 12) KIRN, A., in Braatz und Schneider (Eds): *Symposium on the pharmacodynamics of Silymarin* (1974), 46-55, Urban u.Schwarzenberg, München-Berlin 1976
- 13) MATTERSBERGER, J., *Dissertation*, Universität Innsbruck (1977)
- 14) SONNENBICHLER, J., MATTERSBERGER, J., ROSEN, H., *Hoppe-S.s' Ztg.Physiol.Chem.* 357, 1171-1180 (1976)
- 15) MACHICAO, F., SONNENBICHLER, J., *Hoppe-S.s' Ztg.Physiol.Chem.* 358, 141-147 (1977)
- 16) MURAMATSU, M., HODNETT, J.L., BUSCH, H., *Biochim.Biophys. Acta* 91, 592-597 (1964)
- 17) HAYOE, F.G.J., QUAGLINO, D., *Nature* 205, 151-154 (1965)
- 18) BRESNICK, E., *Meth.Canc.Res.VI*, 347-391 (1971), *Acad.Press,N.J. London*
- 19) BRODY, S., BALIS, M.E., *Canc.Res.* 19, 538-543 (1959)
- 20) CHANDRA, P., APPEL, W., in *"Methoden der Molekularbiologie"*, G.Fischer-Verlag, Stuttgart, 1973
- 21) POULSON, R. in *"Ribon.Acids"*, Springer-Verlag, Berlin,N.J. 243-261 (1973)
- 22) HALBACH, G., TROST, W., *Arzneim.Forsch.* 24, 866-868 (1974)
- 23) MENNICKE, W.H., *Dtsch.Apoth.Ztg.* 115, 1205-06 (1975)
- 24) BÜLLES, H., BÜLLES, J., KRUMBIEGEL, G., MENNICKE, W.H., NITZ, P., *Arzneim.Forschung.* 25, 6, 902-905 (1975)
- 25) HÖLZL, J., *Dtsch.Apoth.Ztg.* 115, 1333-1338 (1975)
- 26) DAOUST, R., in *"Liver Function"* 3-10, *Inst.Biol.Sci.*, Washington, D.C. (1974)
- 27) BAUR, H., KASPEREK, S., PFAFF, E., HOPPE, S., *Physiol.Chem.* 356, 827-838 (1975)
- 28) BERG, T., BOMAN, D., SEGLEN, P.O., *Exp.Cell Res.* 72, 571-574 (1973)
- 29) GUGUEN-GUILLONZO, C., TICHONICKY, L., SZAJNERT, M., SCHAPIRA, F., KRUK, J., *Biol.Cell.* 31, 225-234 (1978)
- 30) DAST, A.G., LOUIS, L.N., HOFFENBERG, R., *Exp.Cell Res.* 76, 41-46 (1973)
- 31) BERRY, M.N., KUM, E., *Eur.J.Biochem.* 27, 395-400 (1972)
- 32) GOODRIDGE, A.G., *J.Biol.Chem.* 248, 1932-1938 (1973)

- 33) SEGLEN, P.O., Exp.Cell Res. 76, 25-30 (1973)
- 34) SEIFTER, S., HARPER, E., in "Meth.in Enzymology" 19, 613-635, Acad.Press N.J. (1970)
- 35) MÜLLER, M., SCHREIBER, M., KARTENBECK, J., SCHREIBER, G., Hoppe-S.s' Ztg.Physiolog.Chem. 353, 736-737 (1972)
- 36) HOWARD, R.B., PESCH, L.A., J.Biol.Chem. 243, 11, 3105-3109 (1968)
- 37) RERABEC, J.u.E. in "Leitfaden der Gewebezüchtung", Gustav-Fischer-Verlag, Jena, 1960
- 38) SCHREIBER, G., SCHREIBER, M., Sub.Cell.Biochem. 2, 307-383 (1973)
- 39) WAYMOUTH, Ch., J.Nat.Canc.Inst. 22, 1003-1015 (1953)
- 40) GOOD, N.E., ZAWA, S. in "Meth. in Enzymol." Vol.24 B, 53-65 (1975) Acad.Press N.J.
- 41) WAGLE, S.R., INGEBRETSEN, W.R., Meth.in Enzymol. 35, 579-594 (1973)
- 42) PLAGEMANN, P.G.W., J.Cell Physiol. 77, 213-240 (1970)
- 43) HAUSCHKA, P., Meth.Cell Biol. 7, 418-454 (1973)
- 44) WILZBACH, K.E., J.Americ.Chem.Soc. 79, 1013 (1957)
- 45) TAUBE, R.A., Biochem.Biophys.Acta 255, 6 - 18 (1972)
- 46) LECOMTE, J., DAMAS, J., C.R.Soc.Biol. 16S, 1449-1451 (1974)
- 47) BOCCHINI, B., CORDANI, A.M., BRUNETTI, M., PORCELLATI, G., Pharmacol.Res.Comm. 5, 231-238 (1973)
- 48) RAMELLI, G., MELDOLESI, J., Ac.Forsch. 24, 806-808 (1974)
- 49) FAULSTICH, M., SCHÄFER, A.J., WECKAUF, M., Hoppe-Seyler's Zeitg.Physiolog.Chem. 358, 181-184 (1977)
- 50) JAHN, W., Cytobiologie 15, 452-462 (1977)
- 51) PONTA, H., ALTENDORF, K.H., SCHWEIGER, M., HIRSCH-KAUFMANN, M., Molec.gen.Genet. 149, 145-150 (1976)
- 52) PETZINGER, E., HOMANN, J., FRIMMER, M., Arzneim.Forsch. 25, 4, 571-576 (1975)
- 53) WEBER, M.J., RUBIN, H., J.Cell Physiol. 77, 157-168 (1970)
- 54) BUSS, W.C., STALTER, K., Biochem. 17, 22, 4825-4832 (1978)
- 55) GAL, A., DE GROOT, N., HOCHBERG, A.A., FEBS-Letters 94, 1, 25-27 (1978)
- 56) STRÄTTLING, W.H., Nucl.Ac.Res. 3, 5, 1203-1212 (1976)
- 57) CHAMBON, R., Ann.Rev.Biochem. 44, 613-638 (1975)
- 58) SCHÜTZ, G., NGUYEN-HUN, M.C., GIESECKE, K. u.a., Old Spring Harbour Symposium, Vol. 17, 2, 617-624 (1978)
- 59) TOWLE, H.C. TSAI, M., TSAI, S., O'MALLEY, B.W., J.Biol.Chem. 252, 7, 2396-2404 (1977)
- 60) TRANIELLO, S., MUZZONI, M. u.a., Biochim.Biophys.Acta 520, 664-670 (1978)
- 61) MUNNS, T.W., KATZMANN, P.A., Biochem. 10, 4941-4948 (1971)
- 62) BILLING, R.J., BARBIROLI, B., SMELLIE, R.M.S., Biochem. Biophys.Acta 190, 52 u. 60 (1969)
- 63) SHEID, B., Experientia 34, 7, 877-878 (1977)
- 64) PULVERTAFT, R.J.V., Lancet. 238-241 (1964)
- 65) ZURHAUSEN, H., SCHULTE-HOLTHAUSEN, H., Nature 227, 245-248 (1970)
- 66) ADAMS, A., LINDAHL, T., KLEIN, G., Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 10 2888-2892 (1973)
- 67) VOGEL, G., TROST, W., MENGES, K., Naunyn-Schiedeborgs Arch. Pharmacol., R. 19 (1977)
- 68) ZOLTAN, Ö.T., GYÖRI, F., Arzneim.Forsch. 20, 1248-1249 (1970)
- 69) TROST, W., HALBACH, G., Experientia 34, 8 1051-1052 (1978)
- 70) SONNENBICHLER, J., POHL, A., Hoppe-S.'s Ztg. Physiolog.Chem. im Druck (1979)

- 71) CHAMBON, P., RAMUR, M., MANDEL, P., DOLY, J., *Bioch.Biophys. Acta*, 504-519 (1968)
- 72) JOHNSON, J.P., JANT, B.A., KAUFMANN, S., SOKOLOFF, L., *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 489-500 (1971)
- 73) WILLIAM, F., MARCLUFF, J., EDWIN, C., MURPHY, J., CHIH HUANG, C., *Biochemistry* 12, 3440-3446 (1973)
- 74) STIRPE, F., FIUME, L., *Biochem.J.* 105, 779-782 (1967)
- 75) SCHILDER, M., *Therapiewoche* 20, 52, 3446-3457 (1970)
- 76) FINTELMANN, V., *Phys.Med.Rehab.* 15, 20-21 (1974)
- 77) BODE, J.C., SCHMIDT, K., DÜRR, H.K., *Med.Klin.* 72, 12, 513-518 (1977)
- 78) JANIÄK, B., KESSLER, B., KUNZ, W., SCHNIEDERS, B., *Arzneim. Forsch.* 23, 9, 1322-1326 (1973)
- 79) RAUEN, H.M., SCHRIEWER, H., *Arzneim.Forsch.* 23, 148-149 (1973)
- 80) BARERINO, F., SUCIU, A., COTUTIU, C., BAN, A., *Wien.Klin. Wschr.* 89, 90-95 (1977)
- 81) SHINOZUKA, H., FARBER, J.L., KONISHI, Y., ANUKARAHANONTA, T., *Federation Proceedings* 32, 4, 1516-1526 (1973)
- 82) DECKER, K., KEPPLER, D., RÜDIGER, J., DOMSCHKE, W., *Hoppe-S.'s Ztg.Physiol.Chem.* 352, 412-418 (1971)
- 83) HOFMANN, F., WAGLE, S.R., DECKER, K., *Hoppe-S.'s Ztg. Physiol. Chem.* 357, 1395-1400 (1976)
- 84) GRESSNER, A.M. GREILING, H., *FEBS Lett.* 1, 77-81 (1976)
- 85) ARIAS, J.M., DOYLE, D., SCHIMKE, R.T., *J.Biol.Chem.* 244, 3303-3315 (1969)
- 86) O'MAALOE, R. in *Lehninger, A.L. Verlag Chemie* 1977, Weinheim, New York, S. 813
- 87) ILAN, J., SINGER, M., *J.Mol.Biol.* 91, 39-51 (1975)
- 88) GRUMMT, J., *Eur.J.Bioch.* 79, 133-141 (1977)
- 89) VIDRICH, A., AIRHART, J., BRUNO, M.K., KHAIRALLAH, E., *Bioch.J.* 162, 257-266 (1977)
- 90) SCHIMKE, R.T., DOYLE, D., *Annu.Rev.Bioch.* 39, 929-968 (1970)
- 91) DOYLE, D., TWETO, J., *Meth.Cell Ciol.* 10, 235-259 (1975)
- 92) GAN, J.C., JEFFAY, H., *Bioch.Biophys.Acta* 148, 448-459 (1967)
- 93) HOD, J., HERSCHKO, A., *J.Biol.Chem.* 251, 14, 4458-4467 (1976)
- 94) SEGLEN, P.O., REITH, A., *Biochim.Biophys.Acta* 496, 29-35 (1977)
- 95) BURTON, D.N., COLLINS, J.M., PORTER, J.W., *J.Biol.Chem.* 244, 4, 1076-1083 (1969)
- 96) WEIGAND, K., MÜLLER, M., URBAN, J., SCHREIBER, G., *Exp.Cell Res.* 67, 27-32 (1971)
- 97) BAUER, Ch.H., LUKASCHEK, R., REUTTER, W.G., *Bioch.J.* 142, 221-230 (1974)
- 98) MAGLIULO, E., CAROSI, P.G., MINOLI, L., GORICCI, S., *Arzneim. Forsch.* 23, 1a, 161-167 (1973)
- 99) MAGLIULO, E., SCEVOLA, D., CAROSI, P.G., *Arzneim.Forsch.* 29, II, 7, 1024-1078 (1979)
- 100) MANGANARO, M., DICESARE, L., *Epatologia* 23, 241-246 (1977)
- 101) O'FARRELL, P.H., *J.Biol.Chem.* 250, 10, 4007-4021 (1975)
- 102) LASKEY, R.A., MILLS, A.D., *Eur.J.Biochem.* 56, 335-341 (1975)
- 103) BONNER, W.M., LASKEY, R.A., *Eur.J.Biochem.* 46, 83-88 (1974)
- 104) PLATT, D., SCHNORR, B., *Arzneim.Forsch.* 21, 8, 1206-1208 (1971)
- 105) BRAY, G.A., *Anal.Biochem.* 1, 279-285 (1960)
- 106) BRYANT, J.C., EVANS, V.J., SCHILLING, E.L., EARLE, W.R., *J.Nat.Canc.inst.* 26, 239-242 (1961)
- 107) PAUL, J., *Rev. in "Cell u. Tissue Culture"*, 5.Ausg. S.96 u.437

- 108) GREENE, E.C., Trans.Amer.Phil.Soc. 27, 35-41 (1935)
- 109) PERRY, P., LA TORRE, J., KELLEY, D.E., GREENBERG, J.R.,
Biochem.Biophys.Acta 262, 220-226 (1972)
- 110) MORGAN, J.F., MORTON, H.J., PARKET, R.C., Proc.Soc.exp.Biol.
Med. 73, 1-8 (1950)
- 111) BARTH, C., Inst.für physiolog.Chemie, Univers.München,
persönliche Mitteilung (1978)
- 112) SCHUSTER, G.S., HARE, J.D., in Vitro 6, 427-436 (1971)
- 113) KALTSCHMIDT, E., WITTMANN, H.G., Bioch. 54, 167-175 (1972)
- 114) MEYER, T.S., LAMERTS, B.L., Biochim.Biophys.Acta 107, 144-145
(1965)
- 115) KOBAYASHI, Y., MAUDSLEY, D.V., in "Biological Applications
of Liquid Szintillation Counting, 1974, Acad.Press, New York
- 116) MEJBAUM, W., Z.physiol.Chemie 258, 117-120 (1939)
- 117) DISCHE, Z., Mikrochemie 8, 4-7 (1930)
- 118) LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.,
B,Biol.Chem. 193, 265-275 (1951)
- 119) HEIL, A., ZILLIG, W., FEBS Lett. 11, 165-168 (1970)

L E B E N S L A U F

Heinrich Friedrich R o s e n

Geboren am: 7.10.1948 in Mülheim/Ruhr

Eltern: Heinrich Rosen, Gartenbauingenieur und
Johanna Rosen geb. Windisch

Schulbildung: Pestalozzi-Volksschule in Mülheim/Ruhr
Städt.Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium in Mülheim/Ruhr
Reifeprüfung im Mai 1968

Berufsausbildung:

Studium der Pharmazie Ludwig-Maximilians-Universität München
vom November 1971 bis Februar 1975

Pharm. Staatsexamen	1. Teil	Oktober	1973
	2. Teil	April	1975

Approbation 25. Mai 1975

Wissenschaftliche
Tätigkeit

vom September 1975 bis September 1979
Anfertigung der vorliegenden Arbeit
im Max-Planck-Institut für Biochemie,
Martinsried bei München, unter der
Leitung von Herrn Priv.Doiz.Dr.J.
Sonnenbichler.

